

IN VITRO UNTERSUCHUNGEN
ZUR CHARAKTERISIERUNG
OPIATARTIGER MECHANISMEN
DER DARMWAND

Nikolaus Steigemann

*Diss
München
1984*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554004_0054

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Direktor: Prof. Dr. W. Forth

IN VITRO UNTERSUCHUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG OPIATARTIGER

MECHANISMEN DER DARMWAND

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Nikolaus Steigemann

aus

München

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Kromer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Forth

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1.	Opiate und endogene Opiode	1
1.2.	Darmmotilität	3
1.3.	Fragestellungen	3
2.	<u>Material und Methoden</u>	6
2.1.	Untersuchung peristaltischer Tätigkeit am isolierten Dünndarmsegment	6
2.1.1.	Präparation und Versuchsanordnung	6
2.1.2.	Allgemeiner Versuchsablauf und Auswertung	6
2.2.	Untersuchung der elektrisch induzierten Kontraktion des Längsmuskel-Plexus myentericus-Präparates	9
2.2.1.	Präparation und Versuchsanordnung	9
2.2.2.	Versuchsablauf und Auswertung	9
2.3.	Bestimmung aus der Darmwand freigesetzten oder extra- hierten Dynorphins	12
2.3.1.	Organbadversuch und Probengewinnung	12
2.3.2.	Extraktion des Darmgewebes	12
2.3.3.	Gelchromatographie	12
2.3.4.	Radioimmunassay	13
2.4.	Statistik	16
2.5.	Versuchstiere und Substanzen	16
3.	<u>Ergebnisse</u>	18
3.1.	Wirkung verschiedener Opiode am Dünndarm des Meer- schweinchens	18
3.1.1.	Relative Wirkungsstärke verschiedener Opiode auf die durch exogenes Acetylcholin induzierte Peristaltik	18

3.1.2.	Wirkung von SKF 10.047 (N-Allyl-Normetazocin) am isolierten Dünndarmsegment	21
3.1.3.	Relative Wirkungsstärke verschiedener Opiode am Längsmuskelpreparat	25
3.2.	Freisetzung von Dynorphin aus der Darmwand	26
3.2.1.	Freisetzung von Dynorphin in Gegenwart von Tetrodotoxin	26
3.2.2.	Freisetzung von Dynorphin in Gegenwart von Levorphanol, Dextrorphan oder Naloxon	27
3.3.	Einfluß von neurogenem Streß auf opiatartige Mechanismen der Darmwand	31
3.4.	Wirkung exogenen Acetylcholins am Dünndarmsegment Morphin-abhängiger Meerschweinchen	34
4.	<u>Diskussion</u>	42
4.1.	Methodik	42
4.2.	Unterschiedliche Beteiligung von Opiatrezeptoren an der Steuerung der Peristaltik und der elektrisch induzierten Längsmuskelkontraktion	43
4.3.	Freisetzung von Dynorphin aus der Darmwand	47
4.4.	Entwicklung natürlicher Opiat-Abhängigkeit unter dem Einfluß von neurogenem Streß	48
4.5.	Mögliche Beteiligung eines cholinergen Mechanismus an der Toleranzentwicklung gegenüber Opioiden	54
5.	<u>Zusammenfassung</u>	55
6.	<u>Tabellen</u>	58
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	90

1. EINLEITUNG

1.1. Opiate und endogene Opioid

Die bekannten Wirkungen der Opiate auf ZNS, den Gastrointestinaltrakt und viele vegetative Funktionen werden bereits in sehr geringen Konzentrationen (in vitro z. T. schon im Bereich von 1 nM) beobachtet und sind auf ein Stereoisomer (meist das linksdrehende) beschränkt. Spezifische Antagonisten heben diese Wirkungen auf. Obwohl große Unterschiede im molekularen Aufbau bestehen, besitzen alle Opiate einige essentielle Strukturmerkmale. Diese Eigenschaften weisen auf die Existenz von Opiatrezeptoren hin, deren Nachweis im ZNS und im Plexus myentericus des Darms 1973 gelang (84, 92, 106). Die Rezeptoren beider Organe verhalten sich in vieler Hinsicht ähnlich und werden synaptischen Membranen zugeordnet (85). Inzwischen werden verschiedene Rezeptortypen unterschieden (Übersicht bei 1, 8, 16, 75, 93, 95, 121, 122).

Schon vor dem Nachweis von Opiatrezeptoren war die Existenz eines neurohumoralen Faktors mit opiatartiger Wirkung diskutiert worden (73, 12). 1974/75 gelang die Extraktion opiatartiger Aktivität aus Gehirn (107, 45) und Hypophyse (108, 17). Die Sequenzanalyse des peptidartigen Materials ergab zwei verwandte Pentapeptide, Methionin-Enkephalin und Leucin-Enkephalin (46). Im folgenden wurden zahlreiche weitere Peptide mit opiatartiger Aktivität (Opioid*) in ihrer Struktur aufgeklärt (Übersicht bei 49, 78). Von größerem Interesse im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist ein 1979 von Goldstein et al. (32) aus der Schweinehypophyse isoliertes Peptid

*) Als Oberbegriff für alle Substanzen mit opiatartiger Aktivität hat sich "Opioid" eingebürgert. Unter "endogenen Opioiden" versteht man die aus der körpereigenen Synthese hervorgehenden Peptide mit opiatartiger Aktivität.

(Dynorphin) mit extrem hoher Wirkungsstärke am isolierten Längsmuskelpreparat des Meerschweinchendarms. Immunreaktives Dynorphin wurde immunhistochemisch in Nervenfasern der Darmwand des Meerschweinchens (114) sowie nach Extraktion im Dünndarm des Schweins (105) und des Meerschweinchens (62) nachgewiesen. Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin waren bereits 1976 von Smith et al. (94) im Plexus myentericus des Meerschweinchens nachgewiesen worden. Untersuchungen mit radioaktiv markierten Aminosäuren zeigten, daß die Biosynthese dieser Peptide in der Darmwand stattfindet (96). Wie für Dynorphin wurden auch enkephalinhaltige Nervenfasern in der Darmwand des Meerschweinchens immunhistochemisch dargestellt (51).

Diese Befunde lassen eine physiologische Funktion intestinaler Opiode bei der Steuerung der Darmmotilität vermuten. Diese Annahme findet ihre Bestätigung in einer vermehrten und in ihrer Rhythmik veränderten Peristaltik unter dem Einfluß der Blockade von Opiatrezeptoren des isolierten Meerschweinchenileums mit Naloxon (58, 59). Die Wirkung von Naloxon ist stereospezifisch und kann durch Erhöhung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration abgeschwächt werden (60). Beides steht im Einklang mit einer opiatartigen Natur des zugrundeliegenden Mechanismus. Entsprechend sind die Wirkungen von Naloxon am nicht vorbehandelten und am Morphin-abhängigen Darmpräparat qualitativ gleich, nehmen aber mit steigender Opiat-Abhängigkeit quantitativ zu (61).

1.2. Darmmotilität

Grundsätzlich werden zwei Formen der Darmmotilität unterschieden: Propulsive und nicht-propulsive (lokale) Kontraktionen (siehe 37). Nicht-propulsive Motilität besteht aus lokalen Kontraktionen des Längsmuskels (Pendelbewegungen) oder des Ringmuskels (Segmentierungen) und führt zur Durchmischung des Darminhalts. Propulsive Motilität (Peristaltik) basiert auf Ringmuskelnkontraktionen, die von oral nach aboral über den Darm laufen und den Darminhalt weitertransportieren (siehe 38). Es handelt sich dabei um Reflexaktivität, die durch Dehnungsrezeptoren der Darmwand ausgelöst wird. Proximal (oral) des Dehnungsreizes kommt es zur Kontraktion, distal (aboral) zur Erschlaffung des Ringmuskels, wodurch der Darminhalt ein Stück nach distal befördert wird und dort wiederum zu einem Dehnungsreiz führt. Dies tritt als "peristaltische Welle" in Erscheinung. Jeder Ringmuskelnkontraktion geht dabei eine Längsmuskelnkontraktion voraus, die jedoch für den Weitertransport des Darminhalts nicht von Bedeutung ist (54).

1.3. Fragestellungen

Opiode und Naloxon modulieren nicht nur die durch Dehnung der Darmwand ausgelöste Reflexaktivität ("Spontanperistaltik") des isolierten Meerschweinchenileums, sondern auch die durch exogenes Acetylcholin induzierte Peristaltik: Normorphin führt konzentrationsabhängig zu einer Abnahme, Naloxon dagegen zu einer Zunahme der Acetylcholinwirkung (65). Im Gegensatz hierzu wird die durch Acetylcholin ausgelöste Kontraktur des Längsmuskels weder durch Opiate (83) noch durch Naloxon (Kramer und Schmidt, nicht publizierte Ergebnisse) beeinflusst. Daher soll die relative Wirkungsstärke verschiedener Opiode auf die Wirkung exogenen Acetylcholins am peristaltischen Präparat mit der am Längsmuskel verglichen und versucht werden,

Anhaltspunkte für eine unterschiedliche Beteiligung verschiedener Typen von Opiatrezeptoren (siehe 1.1.) in beiden Darmpräparationen zu finden.

Die Modulation der durch Acetylcholin ausgelösten Peristaltik durch Naloxon weist auf eine gewissermaßen spiegelbildliche Funktion endogener Opiode hin, die mit einer Freisetzung endogener Opiode in Abhängigkeit von der peristaltischen Aktivität einhergehen sollte. Dies wurde von Clark und Smith (11) bezüglich Met-Enkephalin und von Kromer et al. (62) bezüglich Dynorphin bestätigt. Hier soll versucht werden, die spontane Freisetzung von Dynorphin aus der Darmwand mit pharmakologischen Mitteln zu beeinflussen, mit dem Ziel, weitere Anhaltspunkte über die Natur der betreffenden "endorphinergen" Neurone zu erhalten. Der Plexus myentericus enthält spontan aktive Neurone unbekannter Natur (116). Eine etwaige Freisetzung von Dynorphin aus derartigen spontan aktiven Neuronen sollte durch Tetrodotoxin (siehe 81) unbeeinflusst bleiben, während die Freisetzung von Dynorphin aus nicht spontan aktiven Neuronen durch Tetrodotoxin blockiert werden sollte.

Als Hinweis auf die opiatartige Natur des durch Naloxon beeinflussten Mechanismus kann, neben der soeben erwähnten "spiegelbildlichen" Modulation der Peristaltik durch Opiode und Naloxon sowie der Freisetzung endogener Opiode, die qualitativ gleiche Wirkung von Naloxon am nativen und Morphin-abhängigen Darmsegment (61; s. o.) gelten. Die Möglichkeit, mit Hilfe von Naloxon am peristaltischen Präparat den Opiat-Entzug zu quantifizieren, eröffnet die Chance, das Vorkommen etwaiger natürlicher, d. h. durch körpereigene Opiode erzeugter Opiat-Abhängigkeit aufzudecken. Zwar sind die Serumkonzentrationen etwa von β -Endorphin, das durch Streß aus der Hypophyse freigesetzt wird (33), sehr niedrig; Collier et al. (13)

konnten aber mit Normorphin-Konzentrationen, die bei akuter Applikation noch keine agonistische Wirkung am Meerschweinchenileum zeigten, nach Exposition der Längsmuskelpräparate über 24 Stunden ein Entzugsphänomen unter dem Einfluß von Naloxon nachweisen. Tatsächlich reagieren auch Därme von Meerschweinchenfoeten kurz vor dem Wurf auf Naloxon mit einer Entzugskontraktur (57). Diese Befunde lassen es als möglich erscheinen, natürliche Abhängigkeit unter dem Einfluß von neurogenem Streß nachzuweisen.

Am Längsmuskelpräparat des Meerschweinchenileums geht Opiat-Abhängigkeit (die anhand einer Entzugskontraktur unter dem Einfluß von Naloxon erkennbar wird) mit Toleranz gegenüber Opioiden einher (100). Als Mechanismus dieser Toleranzentwicklung wird eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Serotonin (99) bei unveränderter Empfindlichkeit gegenüber Acetylcholin (31) angenommen. Da am isolierten Darmsegment (Peristaltik) im Gegensatz zum Längsmuskelpräparat die Wirkung exogenen Acetylcholins durch Opioide moduliert wird (s. o.), könnte ein entsprechender Unterschied zwischen beiden Präparationen auch hinsichtlich der Toleranzentwicklung bestehen. Es soll daher untersucht werden, ob am peristaltischen Präparat abhängiger Tiere eine Überempfindlichkeit gegenüber Acetylcholin demonstriert werden kann.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Untersuchung peristaltischer Tätigkeit am isolierten Dünndarmsegment

2.1.1. Präparation und Versuchsanordnung

Die Tiere werden dekapitiert, der Dünndarm wird entnommen und das Lumen mit 10 - 20 ml Krebs-Ringer-Lösung (118 mM NaCl; 4,75 mM KCl; 1,2 mM $MgSO_4$; 2,54 mM $CaCl_2$; 1,19 mM KH_2PO_4 ; 25 mM $NaHCO_3$; 11 mM Glukose; 0,02 mM Cholin-HCl; geperlt mit 95 % O_2 und 5 % CO_2) von proximal nach distal gespült. Darmsegmente von 9 cm Länge werden in ein Organbad gebracht. In den herausnehmbaren Boden ist ein Metallröhrchen eingelassen, auf dem das distale Ende des Segments festgebunden wird. Nach Füllung des Darmlumens mit Krebs-Ringer-Lösung wird das proximale Ende des Segments mit einem Faden verschlossen (Abb. 1).

Das Organbad wird im Wasserbad auf einer konstanten Temperatur von $37^{\circ}C$ gehalten und mit Hilfe einer Pumpe während der Äquilibrierphase ständig mit frischer Nährlösung durchströmt. Die Vorspannung des Darmsegments beträgt 1 g. Sein Lumen steht mit einem Vorratsgefäß in Verbindung, dessen Höhe verstellbar ist. Auf diese Weise wird der intraluminale Druck auf den gewünschten Wert eingestellt. Das Vorratsgefäß ist über einen Schlauch an ein Volumeter (siehe 23) angeschlossen. Dieses erlaubt die lineare Registrierung des Volumenauswurfs während der peristaltischen Kontraktion im Bereich von 0 - ca. 3 ml.

2.1.2. Allgemeiner Versuchsablauf und Auswertung

Die Darmsegmente äquilibrieren für 45 Minuten. Während dieser Zeit wird der intraluminale Druck auf - 0,5 cm Wassersäule eingestellt (Ruhedruck), und das Organbad mit Nährlösung (0,5 ml/min) gespült. Anschließend wird der intraluminale Druck auf 2 cm Wassersäule angehoben und so durch

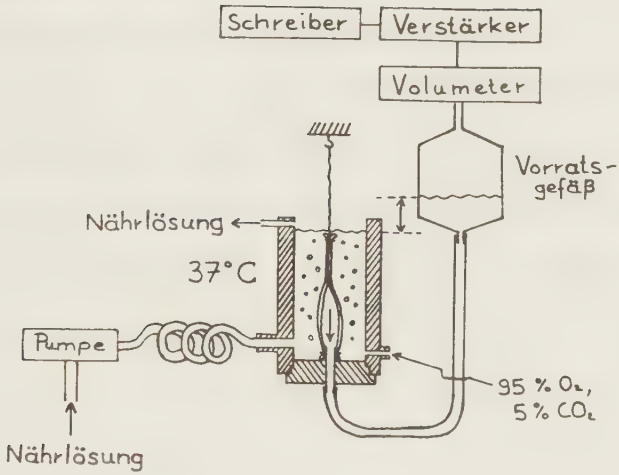


Abb. 1: Versuchsanordnung zur Untersuchung der peristaltischen Tätigkeit des isolierten Dünndarmsegments (in Anlehnung an die von Trendelenburg (109) angegebene Methode).

Dehnung der Darmwand peristaltische Reflexaktivität ausgelöst. Der Druck bleibt während des gesamten Experiments konstant. Sobald die Segmente regelmäßige intermittierende Peristaltik (gleichförmiger Wechsel von Perioden rhythmischer peristaltischer Tätigkeit und Ruhepausen; s. Abb. 2) entwickelt haben, werden die jeweiligen Substanzen getestet.

Ausgewertet wird die Zahl peristaltischer Wellen pro Zeiteinheit (siehe Ergebnisteil). Volumenbewegungen, die weniger als 25 % des registrierten maximalen Volumenauswurfs betragen, bleiben unberücksichtigt. Wie die Beobachtung der aktiven Segmente leicht erkennen läßt, handelt es sich dabei nicht um peristaltische Wellen, sondern um Segmentierungen (nicht-propulsive Aktivität). Da die peristaltische Ringmuskelkontraktion eine Alles-oder-Nichts-Antwort auf den Dehnungsreiz darstellt (55), bleibt die Amplitude des Volumenauswurfs unberücksichtigt.



Abb. 2: Beispiel für intermittierende Peristaltik; gleichförmiger Wechsel von Perioden rhythmischer peristaltischer Tätigkeit und Ruhepausen.

2.2. Untersuchung der elektrisch induzierten Kontraktion des Längsmuskel-Plexus myentericus-Präparates

2.2.1. Präparation und Versuchsanordnung

Ein etwa 6 cm langes Ileumsegment (s. 2.1.1.) wird über eine Pipette gestreift, und der Längsmuskel beidseits des Mesenterialansatzes durchtrennt. Durch Verschieben mit einem Wattebausch wird der Längsmuskel vom darunterliegenden Ringmuskel abgelöst, wobei der Plexus myentericus am Längsmuskel haften bleibt (siehe 87). Beide Gewebe lassen sich gemeinsam als feiner Gewebstreifen ("strip") abheben. Die beiden Enden werden mit einem Faden zu einer Schlaufe gebunden. Diese wird mit einer Hakenelektrode am Boden des Organbads gehalten (siehe 31). Den Gegenpol für die elektrische Reizung bildet eine Ringelektrode am oberen Ende des Organbads. Die supramaximale Reizung - d. h. mit weiterer Reizverstärkung ist keine weitere Zunahme der Kontraktion des "strip" mehr zu erreichen - erfolgt mit einer Frequenz von 0,1 Hz, einer Impulsdauer von 0,7 ms und einer Spannung von 80 V (s. Abb. 3).

Über den Faden (s. o.) ist das Präparat an einem isometrischen Kraftaufnehmer (Q 11; Nennkraft 10 p; Hottinger Baldwin, Darmstadt) befestigt. Die Aufzeichnung (Beispiel s. Abb. 4) der elektrisch induzierten Längsmuskelkontraktionen erfolgt nach Verstärkung (Meßverstärker KWS 3073, Hottinger Baldwin, Darmstadt) auf einem Multi-Pen-Recorder-Rikadenki-R 12.

2.2.2. Versuchsablauf und Auswertung

Während der Äquilibrationphase (45 Minuten) werden die Präparate alle 5 Minuten gewaschen. Sobald die Kontraktionsamplitude einen konstanten Wert erreicht hat, werden die Testsubstanzen appliziert.

Eine hemmende Wirkung (Opiode) wird als prozentuale Abnahme der Amplitude, bezogen auf den Ausgangswert, angegeben (s. Abb. 4).

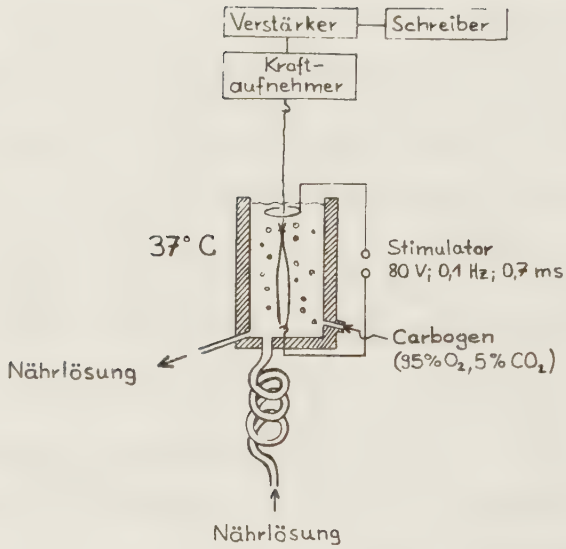


Abb. 3: Versuchsanordnung zur Untersuchung der elektrisch induzierten Kontraktion des Längsmuskel-Plexus myentericus-Präparates.

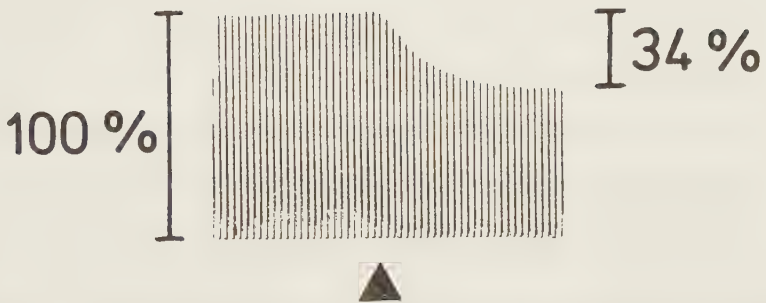


Abb. 4: Beispiel für die Hemmung der elektrisch induzierten Längsmuskelkontraktion durch SKF 10.047 (▲; 20 nM).

2.3. Bestimmung aus der Darmwand freigesetzten oder extrahierten Dynorphins

2.3.1. Organbadversuch und Probengewinnung

Ileumsegmente (s. 2.1.1.) äquilibrieren für 45 Minuten bei einem negativen Darminnendruck entsprechend - 0,5 cm Wassersäule (Ruhedruck). Unter dieser Bedingung findet keine Peristaltik statt. Die Organbäder werden während dieser Zeit mit Krebs-Ringer-Lösung oder mit Nährlösung, die 100 nM Tetrodotoxin enthält, mit einer konstanten Flußrate von 1 ml/Minute perfundiert. In einer zweiten Versuchsreihe mit gleichem Versuchsablauf werden Darmsegmente gegenüber Levorphanol, Dextrorphan oder Naloxon (jeweils 500 nM) exponiert.

90 Minuten nach Beendigung der Perfusion werden aus jedem Organbad 5 ml Nährlösung zur Bestimmung der Freisetzung von Dynorphin entnommen, für jede Gruppe (Versuchsbedingung) gepoolt, und mit 1 N HCl auf pH 1 eingestellt. Sofort anschließend werden die Proben bei -70°C eingefroren und lyophilisiert. Jeder Pool beinhaltet Proben aus 4 - 6 Organbädern (siehe Ergebnisteil), die Darmsegmente verschiedener Tiere enthalten.

2.3.2. Extraktion des Darmgewebes

Zur Extraktion (Bestimmung des Gesamtgehaltes an Dynorphin) werden 2,5 g Ileumgewebe entsprechend dem Gewicht von etwa 6 Segmenten (s. 2.3.1.) verwendet. Das Gewebe wird in kleine Stücke zerschnitten, in zwei Volumina 0,1 N HCl 10 Minuten gekocht, homogenisiert (4 Minuten, 0°C) und zentrifugiert ($140.000 \times g$, 90 Minuten, 4°C). Der Überstand wird bei -70°C eingefroren und lyophilisiert.

2.3.3. Gelchromatographie

Das Lyophilisat von Organbadproben (s. 2.3.1.) bzw. Darmextrakten (s. 2.3.2.) wird in 5 ml 0,1 M Essigsäure aufgenommen und über Sephadex G 50 s.f.

(Säule 80 x 2,5 cm) bei 4° C chromatographiert. Eluiert wird bei einer Flußrate von 15 ml/Stunde mit 0,1 M Essigsäure. Fraktionen à 5,0 ml werden gesammelt und lyophilisiert. Die UV-Absorption des Eluats wird bei 276 nm fortlaufend aufgezeichnet. Leer- und Bettvolumen werden durch Aufnahme von 1 mg Serumalbumin und 0,3 mg Tyrosin, unter sonst gleichen Bedingungen wie bei Probenaufgabe, anhand der betreffenden UV-Absorptionen bestimmt.

2.3.4. Radioimmunassay

Die radioimmunologische Bestimmung von Dynorphin erfolgt nach der von Höllt et al. (43) angegebenen Methode. Der Radioimmunassay (RIA) wird bei 0° C in Polypropylen-Töpfchen (Eppendorf) ausgeführt, um die Adsorption von Dynorphin an die Gefäßwand möglichst gering zu halten (vgl. 27). Die Probenlyophilisate werden in 600 µl (Organbad, s. 2.3.1.) bzw. in 5 ml (Darmextrakt, s. 2.3.2.) Puffer B (s. u.) aufgenommen. Pro Ansatz werden 250 µl Probe bzw. 200 µl Puffer B und 50 µl Standard (in Puffer B; Eichreihe) und anschließend 50 µl Tracer (^{125}J -Dynorphin-(1-13); Schwein; ca. 10.000 cpm pro Ansatz) pipettiert. Die Inkubation wird mit 100 µl Antiserum (Endverdünnung 1:80.000) gestartet und erfolgt bei 0° C über 16 Stunden.

Folgende Puffer finden Verwendung:

Puffer A: 0,02 M Phosphat (82 % Na_2HPO_4 , 18 % NaH_2PO_4); 0,15 M NaCl; 0,01 % Thimerosal; 0,1 % Gelatine; 0,01 % Serumalbumin (Rind). Die Einstellung auf pH 7,5 erfolgt mit primärem bzw. sekundärem Natriumphosphat mit Hilfe einer pH-Elektrode.

Puffer B: Puffer A mit zusätzlich 0,1 % Triton X-100.

Das Antiserum gegen Dynorphin-(1-13) wurde von Dr. A. Goldstein, Palo Alto, Kalifornien, zur Verfügung gestellt (Antiserum "Lucia"). Es zeigt

keine nennenswerte Kreuzreaktivität mit Enkephalinen und verschiedenen β -Endorphin-Fragmenten (27). Die Verdünnung erfolgt mit Puffer 8.

Eichreihe:

Die Verdünnungsreihe von synthetischem Dynorphin-(1-13) in Puffer 8 umfaßt 10 verschiedene Konzentrationen im Bereich von 2 - 2000 fMolen/Ansatz.

Die Trennung des freien vom gebundenen Tracer erfolgt durch Adsorption des freien Anteils an Aktivkohle. 500 μ l Kohleaufschwemmung (12,5 g Aktivkohle/l Puffer A + 5 g Serumalbumin) werden jedem Ansatz zupipettiert. Nach 10 Minuten (0° C) wird die Kohle in einer Eppendorf-Zentrifuge über 4 Minuten abzentrifugiert. 750 μ l des Überstandes werden im γ -Counter gezählt.

Die maximal mögliche spezifische Bindung ergibt sich als Differenz aus c_0 und c_u (s. u.). Alle Meßwerte werden hierauf bezogen und als prozentuale Verdrängung des Tracers ausgedrückt. Aus der Eichkurve (Beispiel siehe Abb. 5) ist nun der Gehalt der Probe an Dynorphin abzulesen.

Kontrollwerte:

1. c_t : Zur Kontrolle der Adsorptionskapazität der Aktivkohle werden 350 μ l Puffer 8 und 50 μ l 125 J-Dynorphin pipettiert. Nach Adsorption des Tracers an Aktivkohle (s. o.) wird die nicht adsorbierte, verbleibende Radioaktivität gemessen.
2. c_u : Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung von Dynorphin an Serumbestandteilen werden 200 μ l Puffer 8, 50 μ l 4 μ M Dynorphin-(1-13), 50 μ l 125 J-Dynorphin und 100 μ l Antiserum pipettiert. Nach Durchführung der Kohletrennung (s. o.) wird im Überstand gemessen. Der Überschuß an kaltem Dynorphin (Endkonzentration: 220 nM) führt zur praktisch vollständigen Verdrängung des Tracers von den spezifischen Bindungsstellen am Antikörper.

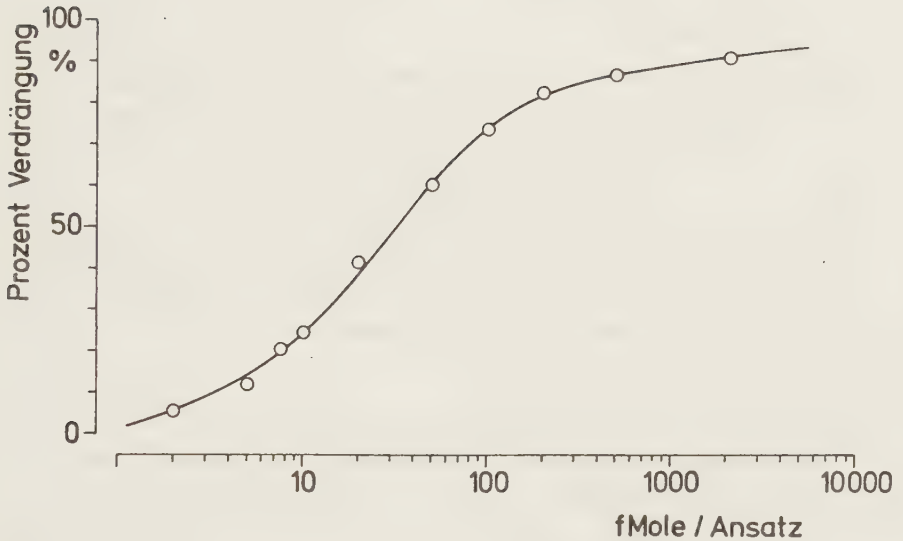


Abb. 5: Beispiel einer Eichkurve des Radioimmunassays für Dynorphin-(1-13).

Abszisse: Menge (in fMolen) des pro Inkubations-Ansatz eingesetzten synthetischen Dynorphin-(1-13). Ordinate: Prozentuale Verdrängung des Tracers (^{125}J -Dynorphin-(1-13), Schwein) vom Antikörper durch das eingesetzte kalte Dynorphin. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von 4 Parallelbestimmungen dar.

3. c_0 : Zur Bestimmung der Gesamtbindung des Tracers (spezifische und unspezifische Bindung) werden 250 μ l Puffer B, 50 μ l 125 J-Dynorphin und 100 μ l Antiserum pipettiert. Nach erfolgter Kohletrennung wird im Überstand gemessen.
4. c_g : Um ein Maß für die eingesetzte Radioaktivität zu erhalten, werden 50 μ l Puffer B und 50 μ l 125 J-Dynorphin pipettiert. Gemessen wird hier ohne vorherige Kohletrennung.

2.4. Statistik

Die Prüfung der Signifikanz der Ergebnisse wird mit dem t-Test nach Student für unverbundene Stichproben durchgeführt.

2.5. Versuchstiere und Substanzen

Verwendet werden männliche bunte Meerschweinchen (Versuchstierzucht G. Riedl, München) mit einem Körpergewicht von 350 - 500 g. Die Tiere erhalten Standardfutter (Altromin-MS) und Wasser ad lib., sie werden bei einer Raumtemperatur von 20° C gehalten.

Verwendete Substanzen:

Acetylcholin (Merck)

Atropin (Sigma)

β -Endorphin, Mensch (Peninsula)

D-Ala²-D-Leu⁵-Enkephalin (Peninsula)

Dextrorphan (Hoffmann-La Roche)

D-Ser²-L-Leu⁵-Enkephalyl-Thr (Peninsula)

Dynorphin-(1-13), Schwein (Peninsula)

125 J-Dynorphin-(1-13) (Dr. Höllt und Dr. Gramsch, Max-Planck-Institut für
Psychiatrie, München)

Ethylketocyclazocin-Methansulfonat (Sterling-Winthrop)

Gelatine (Sigma)

Levorphanol (Hoffmann-La Roche)

Morphin (Merck)

(-)-Naloxon (Endo-Labs.)

Normorphin-HCl (Bios-Products)

Pirenzepin (Thomas)

Sephadex G 50 s.f. (Pharmacie)

Serumalbumin Nr. A - 7888, Rind (Sigma)

SKF 10.047 (N-Allyl-Normetazocin) (Smith, Kline & French)

Tetrodotoxin (Sigma)

Thimerosal (Sigma)

Triton X-100 (Sigma)

Tyrosin (Sigma)

3. ERGEBNISSE

3.1. Wirkung verschiedener Opiode am Dünndarm des Meerschweinchens

Opiate hemmen, und Naloxon verstärkt die Wirkung exogenen Acetylcholins auf die peristaltische Aktivität des isolierten Dünndarmsegments vom Meerschweinchen. Obwohl aber Opiode auch die elektrisch induzierte Kontraktion des Längsmuskelpräparates hemmen, üben sie dennoch keinen Einfluß auf die durch Acetylcholin induzierte Kontraktur dieses Präparates aus (s. 1.3.). Um deshalb eine Aussage zur möglichen Beteiligung unterschiedlicher Opiatrezeptor-Populationen an beiden Präparationen zu erhalten, wird die relative Wirkungsstärke von Opioiden mit unterschiedlichen Affinitäten zu den verschiedenen Rezeptortypen (s. 1.1.) am isolierten Dünndarmsegment (Peristaltik) mit der am Längsmuskelpräparat verglichen.

3.1.1. Relative Wirkungsstärke verschiedener Opiode auf die durch exogenes Acetylcholin induzierte Peristaltik

Sobald die Segmente regelmäßige, intermittierende Peristaltik (s. 2.1.2.; Darminnendruck 2 cm Wassersäule) entwickelt haben, wird Acetylcholin (1 μ M) zu Beginn einer Ruhepause (etwa 1 Minute nach Beendigung einer Aktivitätsperiode) dem Organbad zugesetzt. Die Wirkung wird an Hand der Zahl peristaltischer Wellen, die während der folgenden 5 Minuten durch Acetylcholin ausgelöst werden, quantifiziert. Bezogen wird auf den entsprechenden Basalwert innerhalb 5 Minuten vor Applikation von Acetylcholin. Um eine Überlagerung von Reflexaktivität und Acetylcholin-stimulierter Aktivität so weit wie möglich zu vermeiden, werden nur Darmsegmente verwendet, welche regelmäßige peristaltikfreie Pausen von minimal 5 Minuten Dauer zeigen. Die Auslösung ausreichend regelmäßiger, quantifizierbarer Peristaltik durch Acetylcholin setzt eine minimale Füllung (ca. 2 cm Wassersäule) und damit Basalaktivität voraus. Wegen der erwähnten möglichen Überlagerung mit Reflex-

aktivität (Dehnungsreiz) ist es nicht sinnvoll, die Dauer der durch Acetylcholin ausgelösten Aktivitätsperiode auszuwerten.

Das jeweilige Opioid wird 0,5 Minuten vor Acetylcholin (d. h. 0,5 Minuten nach dem Ende einer Aktivitätsperiode) appliziert. Für jedes Opioid werden zwei Konzentrationen gewählt, die nach den Ergebnissen von Vorversuchen eine Hemmung von 20 - 40 % bzw. 60 - 80 % erwarten lassen. Die IC_{50} -Werte aus Abb. 6 A sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tab. 1: Vergleich der IC_{50} -Werte (nM) verschiedener Opiode am elektrisch stimulierten Längsmuskelpräparat und dem durch Acetylcholin stimulierten peristaltischen Präparat des Meerschweinchen-Dünndarms.

	Rezeptortyp	Längsmuskel	Peristaltik		Quotient Perist./LM	Peristaltik: SKF ^{**} /Ko.
			Ko.	SKF ^{**}		
Dynorphin-(1-13)	k	0,4	1,7	5	4,3	2,9
Ethylketocyclazocin	k	1,2	3,6	7,5	3	2,1
D-Ala ² -D-Leu ⁵ -Enk.	μ^*	19	50	400	2,6	8
β -Endorphin	μ^*	44	80	-	1,8	-
D-Ser ² -L-Leu ⁵ -E.-Thr	μ^*	60	240	900	4	3,6
Normorphin	μ	35	190	>1000	2,9	> 5,3
SKF 10.047	δ	20	Zunahme			

*: Die Angabe bezieht sich nur auf den Meerschweinchen-Dünndarm (s. 4.2.).

**: Um die partialantagonistische Wirkung von SKF 10.047 am peristaltischen Präparat zu quantifizieren, wird die Wirkung verschiedener Opiode jeweils in An- und Abwesenheit (= Kontrolle; Ko.) von SKF 10.047 (40 nM) bestimmt.

Enk. = Enkephalin; E. = Enkephalyl.

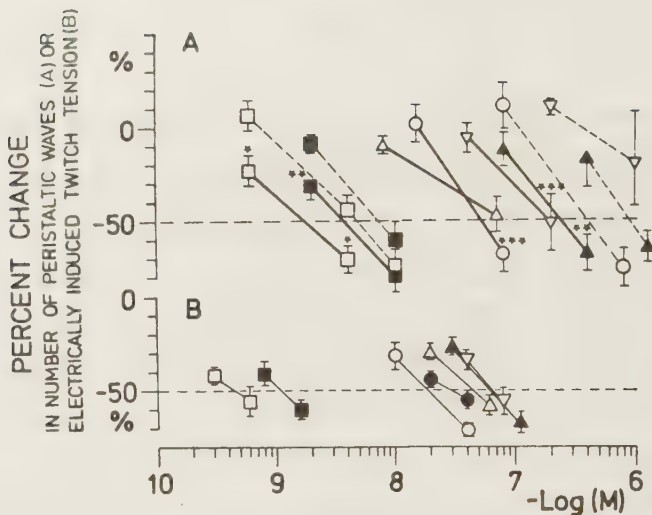


Abb. 6: Einfluß verschiedener Opioiden auf die Peristaltik-auslösende Wirkung von Acetylcholin (A) und die elektrisch induzierte Längsmuskelkontraktion (B) am isolierten Meerschweinchen-Dünndarm.

Symbole: □ Dynorphin-(1-13); ■ Ethylketocyclazocin; ○ D-Ala²-D-Leu⁵-Enkephalin; △ B-Endorphin; ▲ D-Ser²-L-Leu⁵-Enkephalyl-Thr; ▽ Normorphin; ● SKF 10.047. Ordinate: A: Prozentuale Änderung der Zahl peristaltischer Wellen innerhalb 5 Minuten nach Acetylcholin-Applikation (1 µM). Der Wert in Abwesenheit des betreffenden Opioids ist bezogen auf die Zahl peristaltischer Wellen in Abwesenheit des jeweiligen Opioids (= 0 %; $\bar{x} \pm SE$; n = 5 - 15). Durchgezogene Linien repräsentieren die prozentuale Änderung in Abwesenheit, gestrichelte Linien in Anwesenheit von SKF 10.047 (40 nM). B: Prozentuale Änderung der Amplitude der elektrisch induzierten Kontraktion des Längsmuskels ($\bar{x} \pm SE$; n = 4 - 7). Abszisse: Negativer Logarithmus der molaren Konzentration des jeweiligen Opioids.

p-Werte beziehen sich auf den Vergleich der Wirkung einer Opioid-Konzentration in Ab- und Anwesenheit von SKF 10.047: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

Die Kontrollwerte (Zahl der durch Acetylcholin induzierten peristaltischen Wellen in Abwesenheit eines Opioids) ergeben keinen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen und werden deshalb gepoolt: $11,7 \pm 0,4$ ($\bar{x} \pm SE$; n = 261).

3.1.2. Wirkung von SKF 10.047 (N-Allyl-Normetazocin) am isolierten Dünndarmsegment

SKF 10.047 besitzt, bei gleichem Versuchsablauf wie in 3.1.1., eine den übrigen Opioiden (s. 3.1.1.) entgegengesetzte Wirkung: Die Zahl peristaltischer Wellen pro 5 Minuten nach Acetylcholin-Applikation nimmt unter dem Einfluß von SKF 10.047 konzentrationsabhängig zu (Abb. 7; Beispiele zeigen Abb. 8 B und D). Die Kontrollwerte (peristaltische Aktivität nach Acetylcholin-Applikation) in den verschiedenen Gruppen lassen keine signifikanten Unterschiede erkennen und werden daher gepoolt: $10,2 \pm 1,0$ ($\bar{x} \pm SE$; $n = 71$).

Wie die durch Acetylcholin ausgelöste Peristaltik zeigt auch die spontane Peristaltik (Reflexaktivität aufgrund der Dehnung der Darmwand) eine konzentrationsabhängige Zunahme der Zahl peristaltischer Wellen unter dem Einfluß von SKF 10.047 (Abb. 7; Beispiel s. Abb. 9 A). Bei diesen Versuchen wird SKF 10.047 während einer Periode peristaltischer Aktivität dem Organbad zugesetzt, um auch etwaige inhibitorische Komponenten der SKF-Wirkung unmittelbar demonstrieren zu können. Wegen der großen interindividuellen Streuung der Länge der peristaltikfreien Pausen wird über einen Zeitraum von jeweils 20 Minuten vor und nach Applikation von SKF 10.047 ausgewertet.

Bei niedrigen SKF-Konzentrationen (ca. 100 nM) zeigen einige wenige Segmente eine Abnahme der Häufigkeit peristaltischer Wellen (Beispiel s. Abb. 9 B). Für die gesamte Gruppe ist dieser Effekt jedoch statistisch nicht signifikant (vgl. Abb. 7).

Um antagonistische Eigenschaften von SKF 10.047, die in der Literatur an Hand von in vivo-Versuchen beschrieben sind (74), am vorliegenden in vitro-Modell zu testen, wird unmittelbar vor Zugabe des jeweiligen Opioids SKF 10.047 in einer niedrigen Konzentration (40 nM) appliziert. Diese Konzentration verursacht nur eine geringe Steigerung der durch Acetylcholin indu-

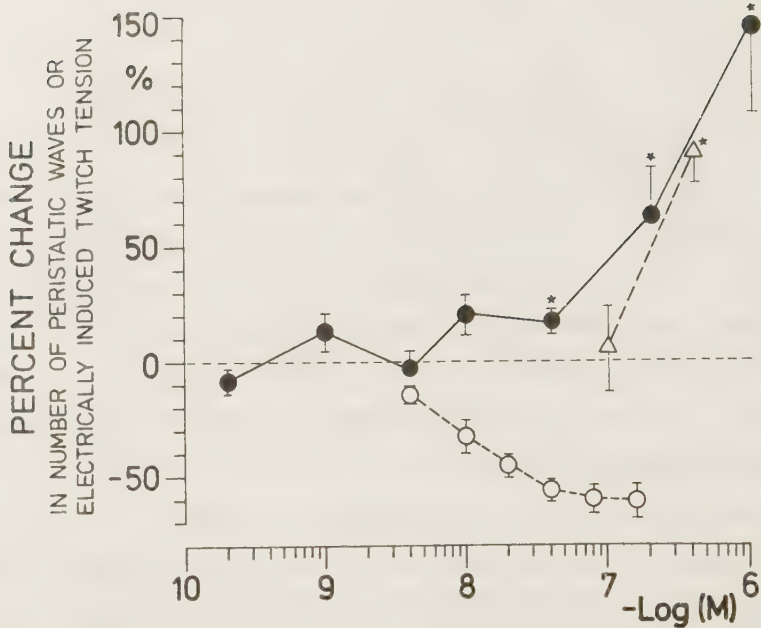


Abb. 7: Wirkung von SKF 10.047 am Dünndarm des Meerschweinchens in vitro.

Abzisse: Negativer Logarithmus der molaren Konzentration von SKF 10.047.

Ordinate: Die Wirkung von SKF 10.047 auf die durch Acetylcholin ($1 \mu\text{M}$) induzierte peristaltische Tätigkeit (●) ist als prozentuale Änderung der Zahl peristaltischer Wellen innerhalb 5 Minuten nach Acetylcholin-Applikation, bezogen auf den entsprechenden Wert in Abwesenheit von SKF 10.047, aufgetragen ($\bar{x} \pm \text{SE}$; $n = 7 - 12$).

Der Einfluß von SKF 10.047 auf die Spontanperistaltik (△) ist als prozentuale Änderung der Zahl peristaltischer Wellen innerhalb von 20 Minuten, bezogen auf den gleichen Zeitraum vor SKF-Applikation, angegeben ($\bar{x} \pm \text{SE}$; $n = 10 - 12$).

p-Werte (* = $p < 0,01$) beziehen sich auf den Vergleich mit den jeweiligen Kontrollwerten in Abwesenheit von SKF 10.047. Diese zeigen keine Unterschiede zwischen den Testgruppen. $\bar{x} \pm \text{SE}$: $10,2 \pm 1,0$ (Acetylcholin-induzierte Peristaltik; $n = 71$) und $35,1 \pm 2,3$ (Spontanperistaltik; $n = 22$).

Die Hemmung der elektrisch induzierten Längsmuskelkontraktion (○) ist als prozentuale Abnahme der Amplitude dargestellt ($\bar{x} \pm \text{SE}$; $n = 4$).

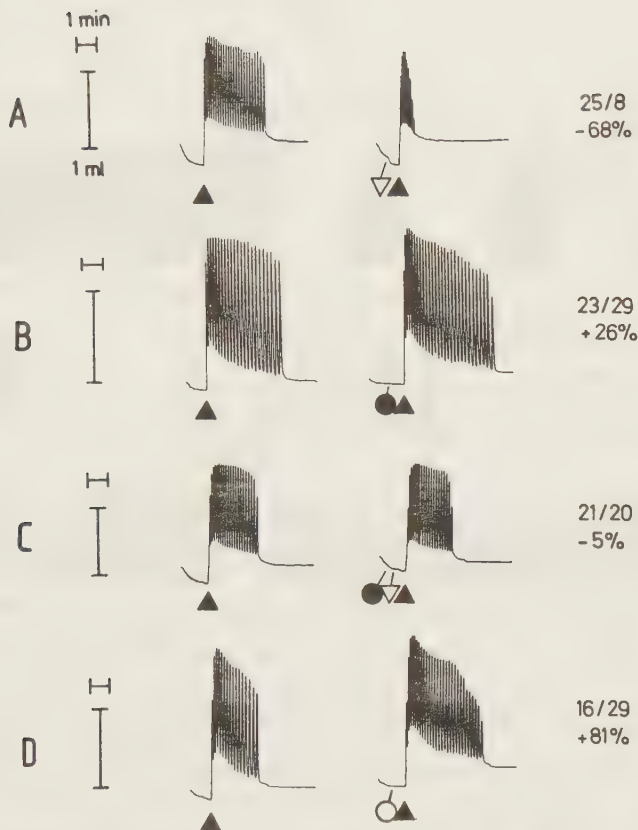


Abb. 8: Beispiele für die Wirkung von Acetylcholin (1 μ M; $\blacktriangle$) in Abwesenheit (jeweils linke Hälfte) und in Anwesenheit (rechte Hälfte) von Normorphin (200 nM; ∇ ; A), SKF 10.047 (40 nM; $\bullet$; B), Normorphin (200 nM) und SKF 10.047 (40 nM) (C), sowie SKF 10.047 (200 nM; $\circ$; D).

Die Abb. zeigt eine Hemmung der Acetylcholin-Wirkung durch Normorphin (A), eine Verstärkung durch SKF 10.047 (D), sowie eine Blockade der Normorphin-Wirkung durch eine geringe Konzentration von SKF 10.047 (C). Die Wirkung dieser niedrigen Konzentration von SKF 10.047 ist in (B) dargestellt.

Die Registrierungen A, B, C und D stammen von verschiedenen Segementen. Während des gesamten Versuches bleibt der Darminnendruck konstant (2 cm Wassersäule). Beispiel für die Auswertung (A): Acetylcholin induziert 25 peristaltische Wellen in Abwesenheit sowie 8 in Anwesenheit von Normorphin entsprechend einer prozentualen Hemmung von 68 %.

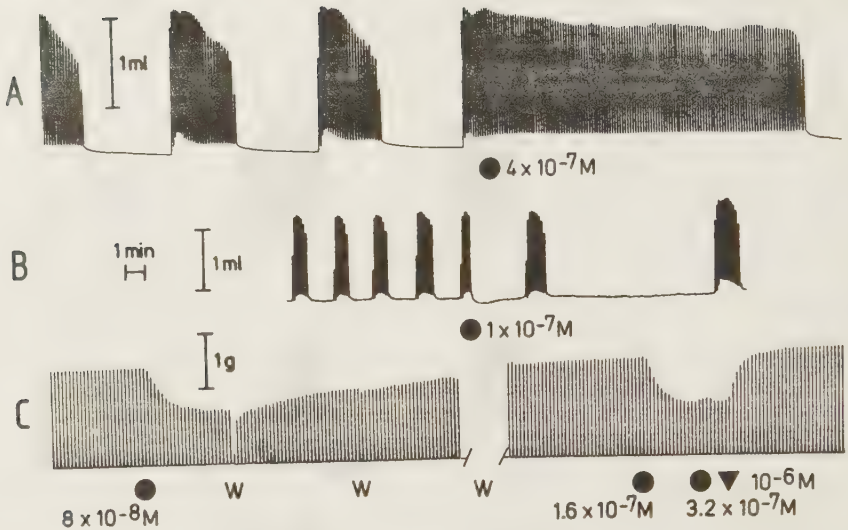


Abb. 9: Beispiele für die Wirkung von SKF 10.047 (●) auf die Spontanperistaltik (A, B) und die elektrisch induzierte Längsmuskelkontraktion (C) des Meerschweinchen-Dünndarms.

A: Verstärkung der Spontanperistaltik durch SKF 10.047.

B: Verminderung der Spontanperistaltik durch SKF 10.047. Diese hemmende Wirkung wird nur bei niedrigen Konzentrationen und an wenigen Darmsegmenten beobachtet. Sie ist für die gesamte Gruppe statistisch nicht signifikant (vgl. Abb. 7, Δ).

C: Hemmung der Kontraktionsamplitude des Längsmuskel-Plexus myentericus-Präparats durch SKF 10.047. Das Beispiel zeigt, daß die elektrisch induzierte Längsmuskelkontraktion auch durch hohe Konzentrationen von SKF 10.047 nicht vollständig gehemmt wird (s. Abb. 7). Die hemmende Wirkung von SKF 10.047 wird jedoch als Zeichen einer opiatartigen Wirkung durch Naloxon ($1 \mu M$; ∇) vollständig antagonisiert. W = Waschen.

zierten Peristaltik (+ 17 %; Abb. 7, Beispiel Abb. 8 B). 0,5 Minuten nach Applikation des Opioids wird Acetylcholin ($1 \mu\text{M}$) ins Organbad pipettiert (s. 3.1.1.). Die Auswertung erfolgt wie unter 3.1.1. angegeben.

SKF 10.047 schwächt die inhibitorische Wirkung von D-Ala²-D-Leu⁵-Enkephalin, D-Ser²-L-Leu⁵-Enkephalyl-Thr und Normorphin erheblich, diejenige von Dynorphin-(1-13) und Ethylketocyclazocin etwas geringfügiger ab (Abb. 6; Tab.1). Die durch 8-Endorphin in einer Konzentration von 70 nM ($n = 11$) hervorgerufene Hemmung wird durch SKF 10.047 vollständig aufgehoben (nicht dargestellt).

Die IC_{50} -Werte jeweils eines Opioids in An- und Abwesenheit von SKF 10.047 werden statistisch nicht gegeneinander getestet, da diese Werte durch Interpolation zwischen unabhängigen Mittelwerten (gewonnen an verschiedenen Darmsegmenten) ermittelt sind. Dieses Vorgehen ist nötig, um akute Toleranz zu vermeiden, die bei zeitlich aufeinanderfolgenden Tests am gleichen Präparat möglich wäre.

Die Bezugswerte (Kontroll-Applikationen von Acetylcholin; s. o.) in den verschiedenen Testgruppen unterscheiden sich nicht und werden daher gepoolt: $11,7 \pm 0,4$ ($\bar{x} \pm \text{SE}$; $n = 261$).

3.1.3. Relative Wirkungsstärke verschiedener Opiode am Längsmuskelpräparat

Die verwendeten Konzentrationen der jeweiligen Opiode werden ähnlich ausgewählt wie am isolierten Dünndarmsegment (s. 3.1.1.). Im Gegensatz zur Peristaltik zeigt SKF 10.047, wie alle übrigen Opiode, eine hemmende Wirkung auf die elektrisch induzierte Längsmuskelkontraktion. Die IC_{50} -Werte sind in Tab. 1 angegeben.

Eine vollständige Hemmung der elektrisch induzierten Kontraktion ist mit SKF 10.047 auch in hohen Konzentrationen (zehnfache IC_{50}) nicht erreichbar (Abb. 7 und Abb. 9 C). Die hemmende Wirkung von SKF 10.047 ist durch Naloxon jedoch vollständig antagonisierbar (s. Abb. 9 C). Mit Ausnahme von SKF 10.047 ergibt sich für die getesteten Opioide eine ähnliche Rangfolge der hemmenden Wirkung in beiden Testsystemen (Längsmuskelkontraktion; Peristaltik). Dabei liegen die IC_{50} -Werte am peristaltischen Präparat um den Faktor 1,8 (β -Endorphin) bis 4,3 (Dynorphin) höher als die entsprechenden Werte am Längsmuskelpräparat (s. Tab. 1 und Abschnitt 3.1.1.).

3.2. Freisetzung von Dynorphin aus der Darmwand

Die Freisetzung von Dynorphin (62) und Met-Enkephalin (11) in Abhängigkeit von der peristaltischen Tätigkeit ist ein wichtiger Hinweis auf eine Funktion endogener Opioide bei der Kontrolle der Dünndarmperistaltik. Im Folgenden wird versucht, durch Beeinflussung der Freisetzung von Dynorphin mit pharmakologischen Mitteln Anhaltspunkte über die Natur dieser "dynorphinergen" Neurone zu erhalten.

3.2.1. Freisetzung von Dynorphin in Gegenwart von Tetrodotoxin

Tetrodotoxin sollte die Freisetzung von Dynorphin aus Nervenendigungen hemmen, vorausgesetzt, die betreffenden Neurone sind nicht spontan aktiv (s. 81). Im letzteren Falle wäre die Wirkung von Tetrodotoxin zumindest nicht vorhersagbar.

Verglichen wird die Freisetzung immunreaktiven Dynorphins aus isolierten Darmsegmenten zweier Testgruppen, die gleichermaßen unter Ruhebedingungen (Darminnendruck entsprechend -0,5 cm Wassersäule), d. h. in Abwesenheit peristaltischer Aktivität, über 90 Minuten im Organbad belassen werden. Eine Gruppe erhält jedoch von Anfang an Tetrodotoxin (100 nM). Diese Konzentration hatte in Vorversuchen zu einer vollständigen Hemmung der Peristaltik geführt.

Nach 90 Minuten werden aus 6 Organbädern (Segmente verschiedener Tiere) je 5 ml Nährlösung entnommen und gepoolt, lyophilisiert, chromatographiert und der Gehalt der Fraktionen an immunreaktivem Dynorphin bestimmt (s. 2.3.). Zum Vergleich wird Gewebeextrakt (s. 2.3.2.) in gleicher Weise aufgearbeitet (Abb. 11).

Die Retentionszeit auf der Säule wird für synthetisches Dynorphin-(1-13) unter den in Abschnitt 2.3. angegebenen Bedingungen bestimmt. Immunreaktives Dynorphin erscheint als breiter Peak im Bereich des 2 - 2,5-fachen Leervolumens. Die Wiederfindungsrate beträgt 80 - 90 %.

Der Gehalt an freigesetztem Dynorphin zeigt in Gegenwart und in Abwesenheit von Tetrodotoxin keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 10). Der Peak im Bereich von Fraktion 86 bis Fraktion 100 (Abb. 10) dürfte nur zum Teil durch die Elektrolyte der Nährlösung bedingt sein (Dr. V. Höllt, persönliche Mitteilung). Auf eine weitere Differenzierung dieses Peaks wird verzichtet, weil bei fehlenden Unterschieden zwischen beiden Testgruppen (s. Abb. 10) keine weitergehende Beantwortung der gestellten Frage zu erwarten ist.

3.2.2. Freisetzung von Dynorphin in Gegenwart von Levorphanol, Dextrorphan oder Naloxon

Die Regulation biologischer Systeme beinhaltet häufig negative Rückkopplungsmechanismen. Wenn dies auch auf die opiatartige Neuromodulation im Plexus myentericus zutreffen sollte, bestünde die Möglichkeit, die Freisetzung von Dynorphin durch Opiatagonisten zu hemmen und durch Opiatantagonisten zu stimulieren.

Die Dynorphinfreisetzung aus isolierten Dünndarmsegmenten wird deshalb unter Ruhebedingungen (-0,5 cm Wassersäule Darminnendruck) in Anwesenheit von Levorphanol (Opiatagonist; 500 nM), dem biologisch inaktiven Stereo-

isomer Dextrophan (500 nM) oder Naloxon (Opiatantagonist; 500 nM) bestimmt. Der Versuchsablauf entspricht im wesentlichen der Darstellung in 3.2.1.. 5 ml Nährlösung aus jedem Organbad (pro Gruppe 4 Segmente verschiedener Tiere) werden gepoolt (= 20 ml) und, wie in Abschnitt 2.3. beschrieben, eingeengt, chromatographiert und dem Radioimmunassay für Dynorphin zugeführt.

Levorphanol, Dextrophan und Naloxon zeigen keinen Einfluß auf den Gehalt immunreaktiven Dynorphins in den Nährlösungen (s. Tab. 2). Aufgrund dieses negativen Ergebnisses wird auf eine weitere Kalibrierung der Säule zur Molekulargewichtsbestimmung des immunreaktiven Materials verzichtet.

Tab. 2: Freisetzung immunreaktiven Dynorphins aus isolierten Darmsegmenten unter Ruhebedingungen (Darminnendruck entsprechend -0,5 cm Wassersäule) in Anwesenheit von Levorphanol, Dextrophan oder Naloxon.

	Dynorphin fMole/g Feuchtgewicht	
	Einzelwerte [*]	Mittelwert
Levorphanol (500 nM)	310 186,5 315,9	270,8
Dextrophan (500 nM)	277,1 316,5	296,8
Naloxon (500 nM)	278 227,7	252,9

^{*}: Jeder Einzelwert bezieht sich auf eine Gruppe aus je 4 Segmenten (1,7 g Gewebe) verschiedener Tiere.

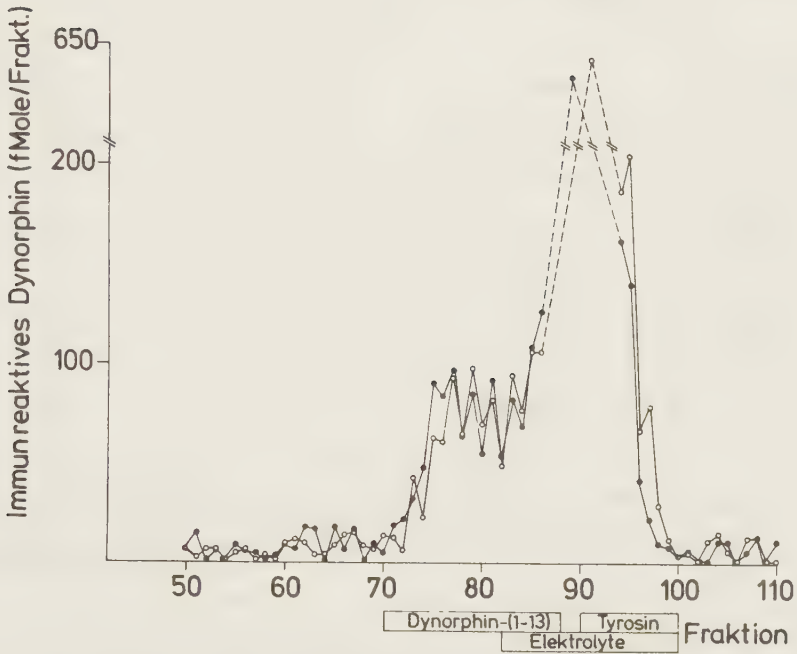


Abb. 10: Freisetzung von Dynorphin aus isolierten Darmsegmenten unter Ruhebedingungen (Darminnendruck entsprechend $-0,5$ cm Wassersäule) in Abwesenheit (○) und Anwesenheit (●) von Tetrodotoxin (100 nM).

Ordinate: Immunreaktives Dynorphin in fMolen/Fraktion. Abszisse: Nummer der Fraktion. Das Leervolumen der Säule umfaßt 30 Fraktionen, das Bettvolumen 100 Fraktionen. Die Balken geben die Retentionsbereiche für Dynorphin-(1-13), Tyrosin und die in der Nährlösung enthaltenen Elektrolyte an.

n (2 - 3) bezieht sich auf Pools aus je 6 Darmsegmenten verschiedener Tiere.

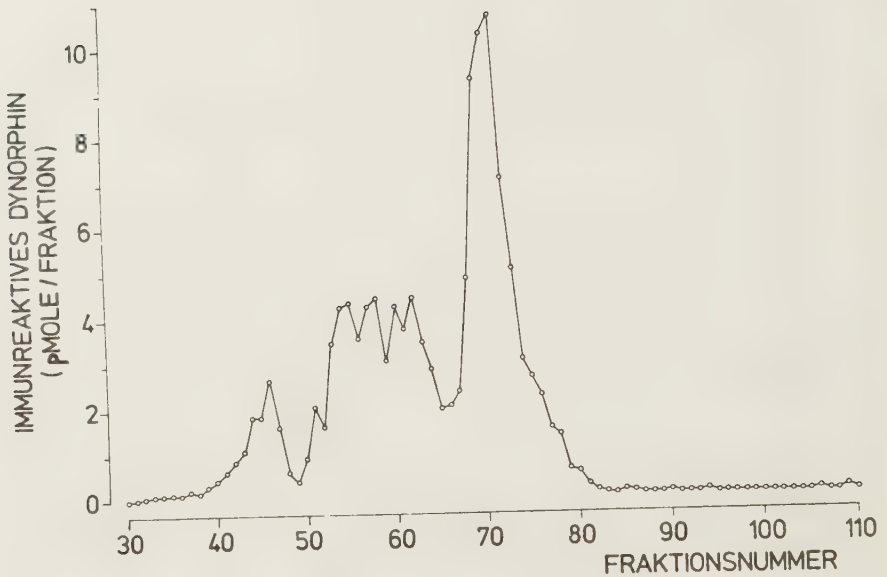


Abb. 11: Beispiel für die Gelfiltration und anschließende Bestimmung des Gehalts an immunreaktivem Dynorphin im Gewebeextrakt (vgl. 2.3.2., 2.3.3. und 2.3.4.).

Die Bedingungen für die Gelfiltration unterscheiden sich im Vergleich zur Chromatographie der Nährlösungen (Abb. 10) insofern, als hier (Gewebeextrakt) die Salze der Nährlösung fehlen. Daher sind keine deckungsgleichen Profile zu erwarten.

3.3. Einfluß von neurogenem Streß auf opiatartige Mechanismen der Darmwand

B-Endorphin und ACTH werden unter Streßeinfluß gemeinsam aus der Hypophyse freigesetzt (33). Dies könnte bei Tieren, die "chronischem" Streß ausgesetzt sind, zu Opiat-Abhängigkeit der Darmsegmente dieser Tiere führen. Collier et al. (13) fanden, daß die Exposition gegenüber Normorphinkonzentrationen, die selbst noch keine akute Wirkung zeigen, nach 24 Stunden eine Opiat-Abhängigkeit des isolierten Dünndarms induzieren kann. Der Grad einer derartigen Opiat-Abhängigkeit läßt sich an Hand der Peristaltik unter Naloxoneinfluß quantifizieren (61).

Männliche Meerschweinchen werden optischen und akustischen Reizen (vgl. 91) über 23 Stunden ausgesetzt. Reproduzierbare Bedingungen werden mit Hilfe einer Zeituhr, welche eine elektrische Klingel und eine 100-Watt-Glühlampe ansteuert, erreicht. Die Tiere werden einzeln in Metallkäfigen gehalten. Die Kontrolltiere werden in ihrer gewohnten Umgebung belassen.

Die Tiere werden immer zur gleichen Tageszeit getötet (10⁰⁰ Uhr), um tageszeitliche Schwankungen der Opioid- und ACTH-Freisetzung zu eliminieren. Jedem Tier werden 2 Darmsegmente entnommen. Jeweils ein Segment wird in 5 ml Nährlösung präpariert. Diese Nährlösung wird ins Organbad übernommen, um weitere Waschvorgänge (Spontanentzug) zu vermeiden. Das jeweils andere Segment wird zweimal für je 5 Minuten in je 500 ml Krebs-Ringer-Lösung gewaschen.

Nach Äquilibrieren der Segmente (s. 2.1.) bei einem Darminnendruck von 2 cm Wassersäule wird 1 Minute nach Ende einer Periode peristaltischer Aktivität Naloxon (200 nM) appliziert. Gemessen wird die Zahl peristaltischer Wellen innerhalb eines 15-Minuten-Zeitraumes vor Naloxon-Applikation sowie jeweils innerhalb 4 aufeinanderfolgender 15-Minuten-Zeiträume nach Naloxon-Applikation (s. Abb. 12).

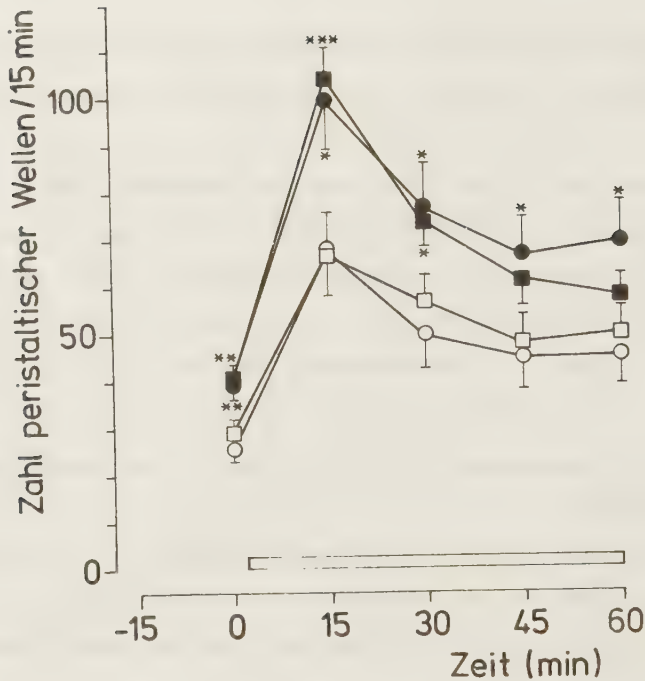


Abb. 12: Einfluß von neurogenem Streß auf die Wirkung von Naloxon am peristaltischen Präparat.

Darmsegmente gestreßter Tiere sowie von Kontrolltieren werden jeweils 2 Gruppen zugeordnet: die Segmente der einen Gruppe werden gewaschen, die der anderen nicht. Symbole: ■ nicht gewaschene Segmente gestreßter Tiere; ● gewaschene Segmente gestreßter Tiere; □ nicht gewaschene Segmente von Kontrolltieren; ○ gewaschene Segmente von Kontrolltieren. Ordinate: Zahl peristaltischer Wellen pro 15-Minuten-Intervall ($\bar{x} \pm SE$; $n = 15 - 18$). Der Darminnendruck bleibt konstant erhöht (2 cm Wassersäule). Abszisse: Zeit (min). Jeder Punkt bezieht sich auf das vorangehende 15-Minuten-Intervall. Der Balken zeigt die Anwesenheit von Naloxon (200 nM) an. p-Werte beziehen sich auf den Vergleich mit den jeweils entsprechenden Kontrollsegmenten (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

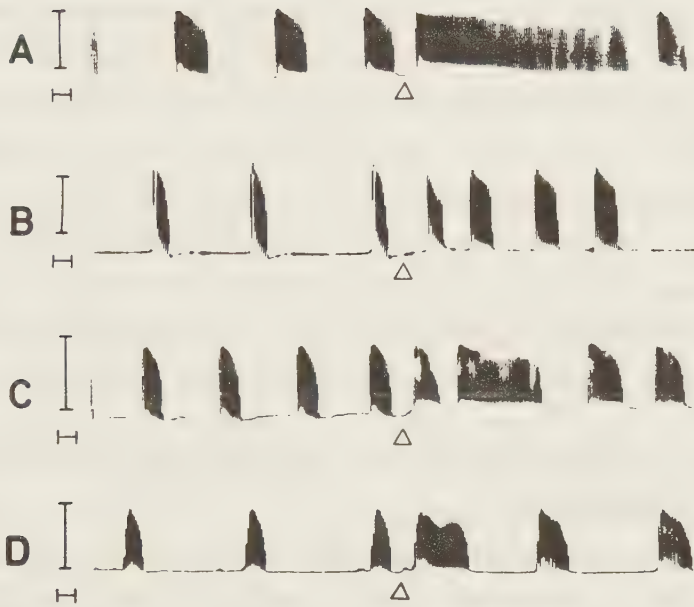


Abb. 13: Beispiele für den Einfluß von neurogenem Streß auf die Wirkung von Naloxon am peristaltischen Präparat.

Alle Registrierungen sind bei konstant erhöhtem Darminnendruck (2 cm Wassersäule) gewonnen. Δ = Applikation von Naloxon 200 nM. Senkrechter Balken: 1 ml Volumenauswurf. Waagerechter Balken: 1 Minute.

Die Segmente gestreßter Tiere (A, C) zeigen unter Naloxoneinfluß eine erheblich stärkere peristaltische Aktivität als Kontrollsegmente (B, D). Dabei ist kaum von Bedeutung, ob die Segmente vor dem Test gewaschen wurden (A, B nicht gewaschen; C, D gewaschen).

Abb. 12 zeigt, daß Naloxon die Zahl peristaltischer Wellen im ersten 15-Minuten-Zeitraum nach Applikation an Darmsegmenten gestreßter Tiere auf wesentlich höhere Werte anhebt als an Kontrollsegmenten (Beispiele s. Abb. 13). Ob die Segmente vor dem Test gewaschen werden, hat hierauf keinen Einfluß. Allerdings ist die Basalaktivität von Darmsegmenten gestreßter Tiere etwas höher als die der Kontrollsegmente. Möglicherweise führt das Präparieren der Segmente in Nährlösung, unabhängig von weiteren Waschvorgängen, in jedem Fall zu einem teilweisen Spontanentzug. Die Naloxonwirkung nimmt bei allen Präparaten mit der Zeit ab (vgl. 59).

3.4. Wirkung exogenen Acetylcholins am Dünndarmsegment Morphin-abhängiger Meerschweinchen

Am Längsmuskelpräparat des Meerschweinchenileums besitzen Opiat-Toleranz und Opiat-Abhängigkeit vermutlich die gleiche Grundlage (s. 100). Wesentlich dürfte hierbei eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Serotonin sein, während die Wirkungsstärke von Acetylcholin unverändert ist. Da am peristaltischen Präparat Opiode jedoch im Gegensatz zum Längsmuskelpräparat die Wirkung von Acetylcholin modulieren, soll untersucht werden, ob auch hinsichtlich der Beteiligung cholinерger Mechanismen an der Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit Unterschiede zwischen beiden Präparationen bestehen.

Meerschweinchen (ca. 450 g) werden unter Äther-Narkose je 4 Morphin-pellets (à 75 mg Morphinbase; vgl. 28) im Flankenbereich subkutan implantiert. Der Wundverschluß erfolgt mit Metallclips. Am 3. Tag nach der Implantation beträgt die Morphin-Konzentration im Blut etwa 1 μM , die maximale Abhängigkeit ist erreicht (31). Deshalb erfolgt die Entnahme des Dünndarms 72 Stunden nach der Implantation. Das in vivo vorhandene Morphin

wird in vitro ganz oder teilweise durch Normorphin substituiert ($5\text{ }\mu\text{M}$ bis 10 nM). Nach Äquilibrieren der Segmente wird jeweils zu Beginn einer Ruhepause (etwa 1 Minute nach dem Ende einer Periode peristaltischer Aktivität) Acetylcholin (100 nM) appliziert.

Die Zahl der durch Acetylcholin innerhalb eines Zeitraumes von 5 Minuten nach Applikation ausgelösten peristaltischen Wellen ist bei Opiat-toleranten Präparaten höher als bei Kontrollsegmenten (Abb. 14; Beispiele s. Abb. 15). Die Basalaktivität (Zahl peristaltischer Wellen pro 20 Minuten vor Acetylcholin-Applikation, umgerechnet auf 5 Minuten) ist bei abhängigen Präparaten in Gegenwart von Normorphin-Konzentrationen von 10 und 100 nM signifikant höher als bei der Kontrollgruppe ($p < 0,01$ für beide Normorphin-Konzentrationen; $n = 14 - 16$). Erwartungsgemäß können diese relativ geringen Normorphin-Konzentrationen den spontanen Entzug hochabhängiger Präparate nicht verhindern. Höhere Konzentrationen von Normorphin (1 und $5\text{ }\mu\text{M}$) substituieren die in vivo vorliegende Morphin-Konzentration ausreichend wirksam, um die Basalaktivität auf Kontrollniveau zu halten (s. Abb. 14; Beispiel s. Abb. 15). Abb. 14, rechte Hälfte, zeigt, daß mit zunehmender Substitution durch Normorphin (also abnehmendem Grad des Spontanentzugs) die Acetylcholin-Wirkung relativ zur Kontrolle zunimmt. Die Präparate zeigen andererseits bei geringerer Substitution des Morphins durch Normorphin einen höheren Grad von Spontanentzug, erkennbar an den höheren Basalaktivitäten (linke Hälfte).

Im Gegensatz zu älteren Vorstellungen könnten in die beschriebenen cholinergen Wirkungen nicht nur Nicotin-Rezeptoren, sondern auch Muskarin-Rezeptoren involviert sein (s. 19). Ein Vergleich mit den Muskarin-Rezeptoren der Magen-Mukosa soll im Folgenden mit Hilfe von Pirenzepin versucht werden.

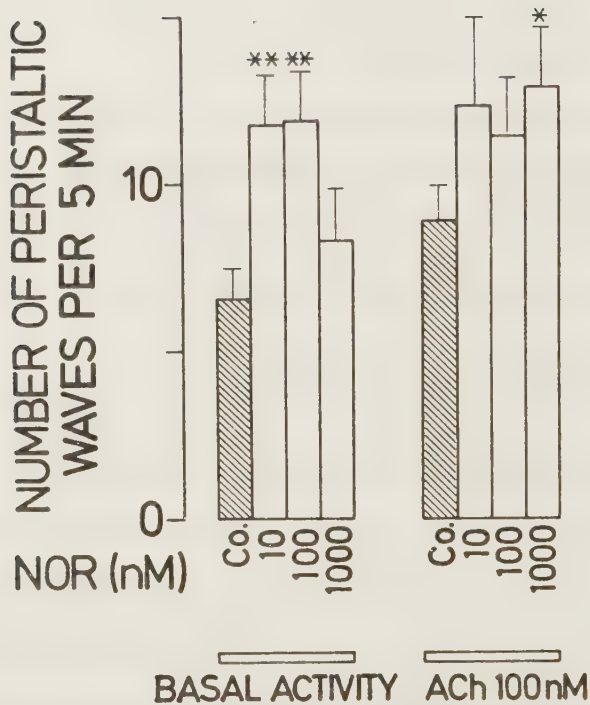


Abb. 14: Durch Acetylcholin (100 nM) induzierte peristaltische Aktivität und Basalaktivität isolierter Darmsegmente Opiat-abhängiger Meerschweinchen (offene Säulen) und nicht abhängiger Tiere (geschlossenen Säulen).

Ordinate: Zahl peristaltischer Wellen/5 Minuten ($\bar{x} \pm SE$; $n = 14 - 16$) nach Applikation von Acetylcholin (100 nM) (rechte Hälfte) bzw. vor Applikation (linke Hälfte).

p-Werte beziehen sich auf den Vergleich mit Kontrollpräparaten (* = $p < 0,05$;

** = $p < 0,01$).

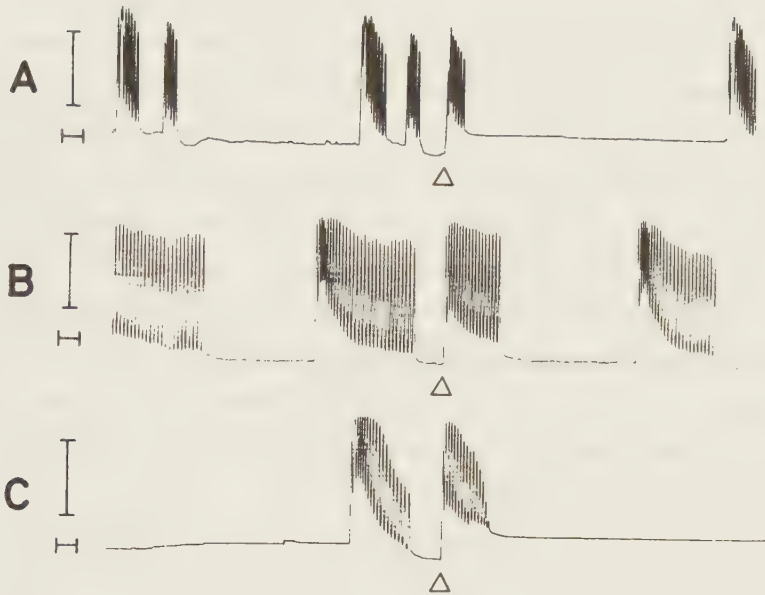


Abb. 15: Beispiele für die Wirkung von Acetylcholin am peristaltischen Präparat Opiat-abhängiger Meerschweinchen.

Alle Registrierungen sind bei konstantem Darminnendruck entsprechend 2 cm Wassersäule gewonnen. Δ = Applikation von Acetylcholin 100 nM.

Senkrechter Balken: 1 ml Volumenauswurf. Waagerechter Balken: 1 Minute.

Die Darmsegmente toleranter, abhängiger Tiere (B, C) zeigen innerhalb eines Zeitraumes von 5 Minuten nach Acetylcholin-Applikation eine deutlich höhere Zahl peristaltischer Wellen als das Kontrollsegment (A). In-vitro-Substitution mit Normorphin: B = 100 nM; C = 1 μ M. Die Normorphin-Konzentration von 100 nM reicht zur vollständigen Substitution des in vivo vorhandenen Morphins nicht aus: Die Basalaktivität (Reflexaktivität; jeweils linke Hälfte) ist bei B stark erhöht, während sie bei Substitution mit 1 μ M Normorphin (C) dem Kontrollniveau (vgl. A) entspricht. Vgl. Abb. 14.

Pirenzepin ist ebenso wie Atropin anticholinerg wirksam und bindet an muskarinartige Acetylcholin-Rezeptoren (s. 35). Im Gegensatz zu Atropin unterscheidet Pirenzepin jedoch angeblich verschiedene Unterklassen dieses Rezeptortyps (5, 34). Für eine 50-prozentige Hemmung der Säuresekretion angereicherter Parietalzellen des Meerschweinchens sind nach Sewing und Hannemann (s. 64) ca. 400-fach höhere Pirenzepin-Konzentrationen nötig als von Atropin. Bezüglich der Hemmung der Spontanperistaltik isolierter Darmsegmente des Meerschweinchens (Beispiel s. Abb. 16) ergibt sich eine Differenz entsprechend Faktor 35 (IC_{50} ; s. Abb. 17), bezüglich der Hemmung der Wirkung exogenen Acetylcholins am peristaltischen Präparat eine Differenz entsprechend ca. Faktor 200 (s. Abb. 18; aus der Dosis-Wirkungs-Kurve extrapoliert).



Abb. 16: Beispiel für die hemmende Wirkung von Pirenzepin ($2 \mu M$; ●) auf die peristaltische Aktivität des isolierten Meerschweinchen-Dünndarms. Senkrechter Balken: 1 ml Volumenauswurf. Waagerechter Balken: 1 Minute.

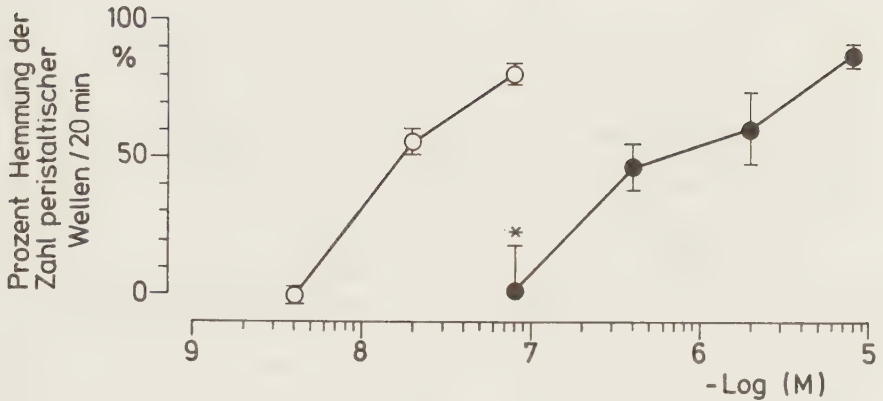


Abb. 17: Vergleich der Wirkungen von Atropin (○) und Pirenzepin (●) auf die Spontanperistaltik des isolierten Meerschweinchen-Dünndarms.

Ordinate: Prozentuale Hemmung der Zahl peristaltischer Wellen pro 20 Minuten nach Applikation der Substanzen bezogen auf den gleichen Zeitraum vor Applikation ($\bar{x} \pm \text{SE}$; $n = 4 - 6$). Abszisse: Negativer Logarithmus der molaren Konzentration des jeweiligen Anticholinergikums.

Der angegebene p-Wert (* = $p < 0,001$) bezieht sich auf den Vergleich beider Substanzen bei der betreffenden Konzentration.

Die für verschiedene Antagonisten-Konzentrationen verwendeten Darmsegmente zeigten keine Unterschiede in der Basalaktivität. Diese Werte werden deshalb gepoolt: $22,3 \pm 2,3$ ($\bar{x} \pm \text{SE}$; $n = 15$) für die "Atropin-Gruppe"; $22,4 \pm 1,5$ ($\bar{x} \pm \text{SE}$; $n = 22$) für die "Pirenzepin-Gruppe".

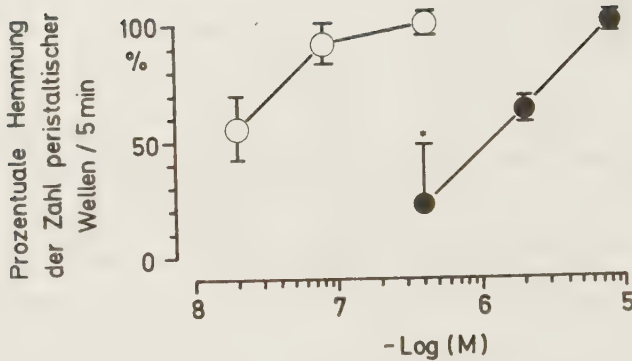


Abb. 18: Vergleich der Acetylcholin-induzierten Peristaltik in Anwesenheit von Pirenzepin (●) und Atropin (○) am isolierten Meerschweinchen-Dünndarm.

Ordinate: Prozentuale Hemmung der Zahl peristaltischer Wellen pro 5 Minuten nach Applikation von Acetylcholin ($1 \mu\text{M}$). Bezogen wird auf die Acetylcholin-Wirkung in Abwesenheit des jeweiligen Anticholinergikums ($\bar{x} \pm \text{SE}$; $n = 3 - 5$). Abszisse: Negativer Logarithmus der molaren Konzentration des jeweiligen Anticholinergikums. * = $p < 0,05$.

Zwischen den Kontrollwerten (Zahl der durch Acetylcholin ausgelösten peristaltischen Wellen in Abwesenheit des jeweiligen Anticholinergikums) ergeben sich keine Unterschiede: $12,9 \pm 1,5$ ($\bar{x} \pm \text{SE}$; $n = 15$) für die "Atropin-Gruppe"; $14,7 \pm 2,0$ ($\bar{x} \pm \text{SE}$; $n = 13$) für die "Pirenzepin-Gruppe".

In allen Testsystemen erzielt Atropin eine stärkere Hemmung als Pirenzepin, der Abstand der IC_{50} -Werte beider Substanzen ist jedoch am Modell der Magensäuresekretion sehr viel größer als am peristaltischen Präparat, so daß hieraus keine Selektivität von Pirenzepin, verglichen mit Atropin, für die cholinergen Rezeptoren der Parietalzellen hergeleitet werden kann. Dieses Ergebnis steht nicht in Einklang mit Schlußfolgerungen von Birdsall et al. (5) zur Selektivität von Pirenzepin und läßt keinen prinzipiellen Unterschied zwischen den cholinergen Rezeptoren der oben verglichenen Modelle erkennen.

4. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit versucht die Funktionen endogener Opiode der Darmwand des Meerschweinchens (s. Einleitung) näher zu charakterisieren, mit dem Ziel, Aussagen zu den beteiligten Rezeptor-Populationen, zur Regulation sowie zur biologischen Bedeutung zu machen.

4.1. Methodik

Die hier verwendete Anordnung zur Untersuchung der Peristaltik, die im Prinzip der von Trendelenburg (109) beschriebenen Methode entspricht, mißt den Volumenauswurf eines proximal verschlossenen, durch Diffusion ernährten Darmsegments. Andere, technisch aufwendigere Methoden bestimmen dagegen den Durchfluß von Nährlösung durch ein isoliertes Segment, das durch Diffusion (7) bzw. über die präparierten Mesenterialgefäße (44) versorgt wird. Die Trendelenburg-Methode erlaubt demgegenüber aufgrund ihrer technischen Einfachheit umfangreiche Versuchsreihen. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für quantitative Aussagen über endogen gesteuerte Motilität, wie sie die Darmpersistaltik darstellt.

Ein Darminnendruck entsprechend 2 cm Wassersäule stellt einen adäquaten Reiz für die Auslösung des peristaltischen Reflexes dar. Dieser Druck ist in der verwendeten Versuchsanordnung auch in peristaltikfreien Intervallen wirksam, ohne aber die Ursache für eine etwa passive Erschlaffung der Darmwand zu sein. Wesentlich höhere Darminnendrucke sind nämlich nicht in der Lage, spastische Darmsegmente zu füllen (97). Die Erschlaffung der Segmente ist vielmehr auch in der Trendelenburg-Anordnung ein endogen gesteuerter Vorgang.

Die Füllung des Segments erfolgt in der Trendelenburg-Anordnung von distal nach proximal. Auch in vivo verursachen jedoch Segmentierungen Verschiebungen des Darminhalts in dieser Richtung. Bei der Kürze der hier

verwendeten Segmente ist daher diesbezüglich kein Unterschied zwischen den Bedingungen in vivo und in vitro anzunehmen.

Die Auswertung der Häufigkeit (im Gegensatz zur Amplitude) peristaltischer Wellen ist sinnvoll, weil die einzelne peristaltische Antwort eine Alles-oder-Nichts-Antwort darstellt (s. z. B. 55). Nicht-propulsive Kontraktionen (Segmentierungen) führen zu Amplituden des Volumenauswurfs, die unter 25 % des maximalen Volumenauswurfs bleiben. Sie werden daher bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

4.2. Unterschiedliche Beteiligung von Opiatrezeptoren an der Steuerung der Peristaltik und der elektrisch induzierten Längsmuskelkontraktion

Martin et al. (74) haben auf die Existenz unterschiedlicher Typen von Opiatrezeptoren hingewiesen (s. 1.1.). Während der letzten Jahre wurde dies an Hand verschiedener Modelle untermauert. Es sind dies: 1) Die unterschiedliche Rangfolge verschiedener Opiode in der Hemmung der elektrisch induzierten Längsmuskelkontraktion des Meerschweinchen-Dünndarms und des isolierten Samenleiters der Maus (70, 113), 2) die unterschiedliche Rangfolge der Bindungsaffinität zu verschiedenen Geweben (70, 66, 67), sowie 3) das unterschiedliche Muster von Kreuztoleranz in verschiedenen Organen (102).

Die Annahme der Existenz unterschiedlicher Rezeptor-Populationen in der Darmwand wird unterstützt durch folgende Beobachtungen: Am Längsmuskelpräparat des Meerschweinchen-Dünndarms hemmen Opiode die elektrisch stimulierte Freisetzung von Acetylcholin (83, 112), während die durch exogenes Acetylcholin induzierte Längsmuskelkontraktur weder durch Opiode (83) noch durch Naloxon (Kromer et al., nicht publizierte Ergebnisse) beeinflussbar ist. Demgegenüber wird sowohl die Reflexperistaltik (58,59, 63) als auch

die durch exogenes Acetylcholin ausgelöste Peristaltik (65) durch Opiode moduliert (vgl. Tab. 3). Kilbinger und Wessler (53) zeigten, daß exogenes Acetylcholin nicht etwa die Freisetzung endogenen Acetylcholins auslöst, sondern im Gegenteil hemmt. Es muß daher ein weiterer Angriffspunkt für Opiode am peristaltischen Präparat im Vergleich zum Längsmuskelpräparat angenommen werden. Eine Hyperpolarisation von Nervenzellen des Plexus myentericus könnte mit diesem möglicherweise postsynaptischen Angriffs-ort für Opiode in Beziehung stehen (82, 117).

Tab. 3: Unterschiedliche Beeinflussung der Acetylcholinwirkung durch Opiode an verschiedenen Präparationen des Meerschweinchen-Dünndarms.

	Längsmuskel-Plexus myentericus-Präparat	Peristaltisches Präparat (Gesamt-Segment)
Wirkung exogenen Acetylcholins	Längsmuskelkontraktur	Rhythmische peristaltische Ringmuskelkontraktionen
Einfluß auf die Acetylcholinwirkung	Opiode: kein Effekt (1) Naloxon: kein Effekt (2)	Opiode: Abnahme (3) Naloxon: Zunahme (3)
Einfluß auf die elektrisch induzierte Acetylcholin-Freisetzung	Opiode: Abnahme (1) Naloxon: Zunahme (4)	?
Schlußfolgerung	Opiatrezeptoren modulieren die Acetylcholin-Freisetzung	Opiatrezeptoren modulieren die Acetylcholinwirkung

1) Paton (83); W. Schaumann (98). 2) Kromer et al., nicht publizierte Ergebnisse. 3) Kromer und Schmidt (65). 4) Waterfield und Kosterlitz (112).

SKF 10.047 (N-Allyl-Normetazocin) aktiviert nach in vivo-Untersuchungen σ -Rezeptoren und blockiert μ - und κ -Rezeptoren (74, 50, 90). Die vorliegenden Befunde mit SKF 10.047 legen eine unterschiedliche Beteiligung der σ -Rezeptoren an den oben diskutierten Angriffsorten in der Darmwand nahe. SKF 10.047 hemmt die Längsmuskelkontraktion (s. 3.1.3.), steigert aber die peristaltische Aktivität (s. 3.1.2.) des Meerschweinchen-Dünndarms. Beide Wirkungen dürften durch die Besetzung von Opiatrezeptoren zustande kommen: Naloxon hebt die durch SKF 10.047 bewirkte Hemmung der Längsmuskelkontraktion vollständig auf, während auf der anderen Seite SKF 10.047 antagonistische Eigenschaften gegenüber den übrigen Opioiden am peristaltischen Präparat entfaltet. In Übereinstimmung mit der Literatur läßt sich die Peristaltik-steigernde Wirkung von SKF 10.047 am besten durch Verdrängung endogen freigesetzter Opiode von μ - und κ -Rezeptoren erklären, zu denen SKF 10.047 hohe Affinität (118) bei fehlender intrinsic activity (74) besitzt.

SKF 10.047 vermindert erheblich die Hemmung der Peristaltik durch Normorphin, einem μ -Rezeptor-Agonisten (70, 104), ebenso wie die durch $D-Ala^2-D-Leu^5$ -Enkephalin und $D-Ser^2-L-Leu^5$ -Enkephalyl-Thr (s. 3.1.2.; Tab. 1). Zwar wirken $D-Ala^2-D-Leu^5$ -Enkephalin und $D-Ser^2-L-Leu^5$ -Enkephalyl-Thr am Samenleiter der Maus über δ -Rezeptoren (119, 102, 25), sie hemmen die Längsmuskelkontraktion des Meerschweinchen-Dünndarms jedoch durch Aktivierung von μ -Rezeptoren (70, 104). Auch die antagonistische Wirkung von SKF 10.047 gegenüber β -Endorphin dürfte am peristaltischen Präparat durch Blockade von μ -Rezeptoren zustande kommen, weil β -Endorphin neben den ϵ -Rezeptoren des Samenleiters der Ratte (101, 103) auch μ -Rezeptoren des Meerschweinchenileums und δ -Rezeptoren des Samenleiters der Maus aktiviert (70).

Die antagonistischen Eigenschaften von SKF 10.047 gegenüber Dynorphin-(1-13) und Ethylketocyclazocin sind schwächer ausgeprägt (s. 3.1.2.; Tab. 1) als gegenüber den oben genannten Opioiden. Dynorphin scheint nach Untersuchungen am Längsmuskel-Plexus myentericus-Präparat einen spezifischen Rezeptor zu aktivieren, der sich vom μ -Rezeptor unterscheidet (9) und wahrscheinlich mit dem k-Rezeptor identisch ist (120, 47, 10). An k-Rezeptoren bindet Ethylketocyclazocin mit hoher Affinität (56). SKF 10.047 verdrängt demnach die jeweiligen Agonisten stärker von μ -Rezeptoren als von k-Rezeptoren (vgl. 118, 122).

Die Aktivierung der Peristaltik durch SKF 10.047 weist darauf hin, daß μ - und k-Rezeptoren, die durch SKF 10.047 blockiert werden, für die Steuerung der Peristaltik des Meerschweinchen-Dünndarms von größerer funktioneller Bedeutung sind als Rezeptoren, die durch SKF 10.047 aktiviert werden (σ -Rezeptoren). Letztere scheinen an der Regulation der Acetylcholin-Freisetzung aus dem Plexus myentericus beteiligt zu sein, allerdings in geringerem Maße als μ - und k-Rezeptoren: nur mit μ - und k-Agonisten, nicht aber mit SKF 10.047 ist eine vollständige Hemmung der elektrisch induzierten Längsmuskelkontraktion zu erreichen.

Die partialantagonistischen Eigenschaften von SKF 10.047 treten am isolierten Längsmuskelpräparat nicht in Erscheinung. Ein endogen aktiver opiatartiger Mechanismus besitzt unter dieser Bedingung offenbar keine funktionelle Bedeutung.

Die Ergebnisse zeigen, daß am isolierten Meerschweinchen-Dünndarm mindestens zwei Angriffspunkte für Opiate vorhanden sind. Dabei ist bei der Kontrolle der Peristaltik zusätzlich zu einem Angriffspunkt, an dem die Wirkung freigesetzten Acetylcholins moduliert wird (65), ein präsynapti-

scher Angriffspunkt wahrscheinlich, an dem die Acetylcholin-Freisetzung moduliert wird. Für die letztere Annahme spricht, daß die Wirkung von Naloxon auf die Peristaltik durch Änderung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration beeinflusst werden kann.(60).

4.3. Freisetzung von Dynorphin aus der Darmwand

Die Abnahme der Basalfreisetzung von Dynorphin durch Auslösung peristaltischer Aktivität (62) könnte im Einklang mit einer Hypothese von J. D. Wood (116) stehen: Danach wird als Folge der Aktivierung von Dehnungsrezeptoren ein spontan aktiver, neuronaler Mechanismus, der die Aktivität des Ringmuskels tonisch hemmt, seinerseits blockiert. Daß Tetrodotoxin die Basalfreisetzung von Dynorphin nicht hemmt (s. 3.2.1.), könnte als Hinweis auf die Existenz spontan aktiver "dynorphinerner" Neurone verstanden werden, ohne dies allerdings schlüssig zu beweisen.

Bei fehlendem Dehnungsreiz ist Naloxon nicht imstande, peristaltische Kontraktionen zu induzieren (Kromer und Schmidt, unveröffentlichte Ergebnisse). Demnach scheint funktionell ein exzitatorischer Teil des Reflexbogens neben der oben diskutierten Hemmung eines inhibitorischen Mechanismus Voraussetzung zu sein für die Auslösung von Peristaltik.

Für etwaige Rückkopplungsmechanismen bei der Freisetzung von Dynorphin ergeben die vorliegenden Versuche, zumindest unter Ruhebedingungen, keinen Anhalt. Die Menge freigesetzten Dynorphins nimmt weder in Anwesenheit eines Opiatagonisten ab noch in Anwesenheit eines Opiatantagonisten zu (s. 3.2.2.).

4.4. Entwicklung natürlicher Opiat-Abhängigkeit unter dem Einfluß von neurogenem Streß

ACTH und B-Endorphin besitzen eine gemeinsame Vorstufe (21, 71) und werden in Streßsituationen aus denselben Sekretgranula des Hypophysenvorderlappens (115) freigesetzt (33). Eine biologische Bedeutung von B-Endorphin im Zusammenhang mit Streß liegt daher nahe (vgl. 76, 77).

Die B-Endorphin-Konzentrationen im Blut, die unter Streßeinfluß erreicht werden, sind zwar niedrig (s. Tab. 4), Untersuchungen von Collier et al. (13; s. Einleitung) lassen jedoch die Entstehung einer Opiat-Abhängigkeit auch bei derart geringen Konzentrationen als möglich erscheinen. Entwicklung von Abhängigkeit gegenüber endogenen Opioiden wäre demnach am wahrscheinlichsten in der Folge von chronischem Streß zu erwarten. Interessant ist, daß sich an Därmen von Meerschweinchenfoeten (kurz vor dem Wurf entnommen) mit Naloxon eine entzugsartige Längsmuskelkontraktur auslösen läßt (57). Möglicherweise stellt diese Situation vor dem Wurf eine Streßsituation dar, unter der es zur Inkretion von B-Endorphin kommt (siehe 18).

Die vorliegenden Versuche zeigen, daß Naloxon an Darmsegmenten neurogen gestreßter Tiere die Zahl peristaltischer Wellen wesentlich stärker erhöht, verglichen mit Kontrolltieren (s. 3.3.). Dies kann analog zu der oben erwähnten Kontraktur des Opiat-abhängigen Längsmuskelpräparates als Entzugsphänomen gedeutet werden. Allerdings zeigen Darmsegmente gestreßter Tiere eine etwas höhere Basalaktivität als Kontrollsegmente. Offenbar verursacht der Präpariervorgang (in 5 ml Nährlösung) bereits einen zumindest teilweisen Spontanentzug. Dies könnte erklären, daß nach weiteren Waschvorgängen kein zusätzlicher Entzug nachweisbar ist (s. 3.3.).

Tab. 4: Übersicht über in der Literatur angegebene B-Endorphin-Konzentrationen im Plasma verschiedener Species. Berücksichtigt sind Werte, die von nicht vorbehandelten Individuen (Basalwerte) bzw. nach einer Vorbehandlung gewonnen wurden, die im weitesten Sinne als Streß zu bezeichnen ist.

Species	bes. Bedingungen	Originalwerte	Extrakt. (+) Chromat. (++) *	Molarität**	Zitat
Ratte	Adrenalektomie	75 fMole/ml 288 fMole/ml		$7,5 \times 10^{-11}$ $2,9 \times 10^{-10}$	Akil et al. (2)
Ratte	Injektion von 0,1 M Phosphat, pH 7,4	34,5-fMole/ml		$3,5 \times 10^{-11}$	Anhut et al. (3)
Ratte	NaCl-Injektion	0,26 ng/ml	+	$7,2 \times 10^{-11}$	Berkenbosch et al. (4)
Ratte	♂ ♂, Äther-Streß ♂, Adrenalektomie	20 pg/ml 53 pg/ml 83 pg/ml	+	$5,7 \times 10^{-12}$ $1,5 \times 10^{-11}$ $2,4 \times 10^{-11}$	Conte-Devolx et al. (15)
	♀ ♀, Äther-Streß ♀, Adrenalektomie	28 pg/ml 36 pg/ml 89 pg/ml	+	8×10^{-12} 1×10^{-11} $2,6 \times 10^{-11}$	
Ratte	NaCl-Injektion Injektion von 15 % Äthanol Immobilisation + Injektion	0,38 ng/ml 0,35 - 0,44 ng/ml 2,22 - 2,82 ng/ml 142 pg/ml	+	$1,1 \times 10^{-10}$ $1 - 1,3 \times 10^{-10}$ $6,3 - 8,1 \times 10^{-10}$	Farah et al. (22)
Ratte	NaCl-Injektion		+/++	$4,1 \times 10^{-11}$	Giraud et al. (29)

Species	bes. Bedingungen	Originalwerte	Extrakt. (+) * Chromat. (++) *	Molarität **	Zitat
Ratte	Adrenalektomie	1,5 ng/ml 8,8 ng/ml		$\frac{4,3 \times 10^{-10}}{2,5 \times 10^{-9}}$	Guillemin et al. (33)
Ratte		0,15 - 0,25 ng/ml	+	$4,3 - 7,2 \times 10^{-11}$	Haracz et al. (36)
Ratte		0,3 ng/ml	+	$8,7 \times 10^{-11}$	Hölldt et al. (40)
Ratte	"Foot-shock" Adrenalektomie	0,4 ng/ml ca. 2,5 ng/ml ca. 2,8 ng/ml	+	$1,2 \times 10^{-10}$ $ca. 7,2 \times 10^{-10}$ $ca. 8,1 \times 10^{-10}$	Hölldt et al. (41)
Ratte (Jap.) (New Zeal.)		0,19 ng/ml 0,09 ng/ml 0,363 ng/ml 0,382 ng/ml	+	$5,5 \times 10^{-11}$ $2,6 \times 10^{-11}$ $1,0 \times 10^{-10}$ $1,1 \times 10^{-10}$	Hutchinson et al. (48)
Ratte		76,4 pg/ml 141,2 pg/ml	+	$2,2 \times 10^{-11}$ $4,1 \times 10^{-11}$	Lissitzky et al. (69)
Ratte	Adrenalektomie	0,12 ng/ml 0,24 ng/ml 0,33 ng/ml 0,51 ng/ml 1,51 ng/ml	+	$3,5 \times 10^{-11}$ $6,9 \times 10^{-11}$ $9,5 \times 10^{-11}$ $1,5 \times 10^{-10}$ $4,4 \times 10^{-10}$	Mueller (79)
Ratte	"tail flick" "hot plate" Äther-Streß Immobilisation NaCl-Injektion	0,24 ng/ml		$6,9 \times 10^{-11}$	Pettibone und Mueller (86)

Species	bes. Bedingungen	Originalwerte	Extrakt. (+) Chromat. (++) *	Molarität **	Zitat
Ratte	"Foot-shock"	1,4 ng/ml 4,3 ng/ml		4×10^{-10} $1,2 \times 10^{-9}$	Rossier et al. (88)
Ratte	Äther-Streß	0,38 ng/ml 1,08 ng/ml		$1,1 \times 10^{-10}$ $3,1 \times 10^{-10}$	Sapun et al. (89)
Hund	NaCl-Injektion	43,1 pg/ml	+	$1,2 \times 10^{-11}$	Levin et al. (68)
Schaf	Fruchtbarkeit	12,7 pg/ml	++	$3,7 \times 10^{-12}$	Wardlaw et al. (111)
	Foeten	51 pg/ml	++	$1,5 \times 10^{-11}$	
	Neugeborene	125 pg/ml 137 pg/ml	++	$3,6 \times 10^{-11}$ $4,0 \times 10^{-11}$	
Rhesus-Affe		163 pg/ml		$4,7 \times 10^{-11}$	Kalin et al. (52)
Mensch	♂ ♀ Schwangerschaft	12 fMole/ml < 10 fMole/ml 62,5 fMole/ml		$1,2 \times 10^{-11}$ $< 1,0 \times 10^{-11}$ $6,3 \times 10^{-11}$	Akil et al. (2)
Mensch		5 - 30 fMole/ml	+	$0,5 - 3,0 \times 10^{-11}$	Breidenbach et al. (6)
Mensch	Kurzstreckenlauf	8,2 - 11,8 pg/ml	+	$2,4 - 3,4 \times 10^{-12}$	Colt et al. (14)
	Langstreckenlauf	18 pg/ml 28 pg/ml	+	$5,2 \times 10^{-12}$ $8,1 \times 10^{-12}$	
Mensch	1. Stadium der Wehentätigkeit	ca. 5 fMole/ml	+	$ca. 5 \times 10^{-12}$	Osontos et al. (18)
	2. Stadium der Wehentätigkeit (Geburt)	ca. 55 fMole/ml ca. 65 fMole/ml	+	$ca. 5,5 \times 10^{-11}$ $ca. 6,5 \times 10^{-11}$	

Species	bes. Bedingungen	Originalwerte	Extrakt. (+) Chromat. (++) *	Molarität **	Zitat
Mensch	Neugeborene	ca. 55 fMole/ml	+	ca. $5,5 \times 10^{-11}$	
		20,5 pMole/l		$2,1 \times 10^{-11}$	Dubois et al. (20)
	Operations-Streß	56,9 pMole/l		$5,7 \times 10^{-11}$	
Mensch	Schwangerschaft	11,5 fMole/ml	+	$1,2 \times 10^{-11}$	Fletcher et al. (24)
	1. Wehenstadium	13,3 fMole/ml	+	$1,3 \times 10^{-11}$	
	2. Wehenstadium	43,8 fMole/ml	+	$4,4 \times 10^{-11}$	
	post partum	58,3 fMole/ml	+	$5,8 \times 10^{-11}$	
	♂	30,5 pg/ml	+/++	$8,8 \times 10^{-12}$	Genazzani et al. (26)
Mensch	♀	31,4 pg/ml	+/++	$9,1 \times 10^{-12}$	
	Entbindung	108 pg/ml	+/++	$3,1 \times 10^{-11}$	
		4,6 pg/ml	+/++	$1,3 \times 10^{-12}$	
	Schwangerschaft	5,0 pg/ml	+/++	$1,4 \times 10^{-12}$	
	Entbindung	56,3 pg/ml	+/++	$1,6 \times 10^{-11}$	Goland et al. (30)
Mensch		1024 pg/ml	+	$3,0 \times 10^{-10}$	Ho et al. (39)
Mensch		3,5 - 6,4 fMole/ml	+/++	$3,5 - 6,4 \times 10^{-12}$	Höllt et al. (42)
Mensch		143 pg/ml		$4,1 \times 10^{-11}$	Kalin et al. (52)
Mensch		58,2 pg/ml	+/++	$1,7 \times 10^{-11}$	
	Elektroakupunktur (15 Minuten)	405 pg/ml	+/++	$1,2 \times 10^{-10}$	Malizia et al. (72)

Species	bes. Bedingungen	Originalwerte	Extrakt. (+) Chromat. (++) *	Molarität **	Zitat
Mensch		ca. 28 fMole/ml		ca. $2,8 \times 10^{-11}$	Neber et al. (80)
Mensch		14,5 pg/ml	+ / ++	$4,2 \times 10^{-12}$	Wardlaw et al. (110)
	Foeten	57 pg/ml	+ / ++	$1,6 \times 10^{-11}$	

*: Die Bestimmung von β -Endorphin im Plasma ist wegen der niedrigen Konzentrationen schwierig. Die deshalb angewandten Reinigungsverfahren tragen sicherlich zur Streuung der angegebenen Werte bei.

** : Der jeweils niedrigste und höchste Wert bei den Species Mensch und Ratte ist unterstrichen.
Einige Werte sind aus Diagrammen der zitierten Arbeiten abgelesen und deshalb mit "ca." bezeichnet.

4.5. Mögliche Beteiligung eines cholinergen Mechanismus an der Toleranz- entwicklung gegenüber Opioiden

Für Opiat-Toleranz und Opiat-Abhängigkeit ist, zumindest am Längsmuskelpräparat des Meerschweinchen-Dünndarms, vermutlich eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Serotonin (99) bei unveränderter Empfindlichkeit gegenüber Acetylcholin (31; s. Einleitung) verantwortlich. Die vorliegenden Befunde zeigen aber, daß an Darmsegmenten toleranter Tiere exogenes Acetylcholin eine stärkere Peristaltik-fördernde Wirkung besitzt als an Kontrollsegmenten (s. 3.4.). Dies weist im Gegensatz zum Längsmuskelpräparat (s. o.) auf eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Acetylcholin als eine Teilursache für die Opiat-Toleranz des peristaltischen Präparates hin.

Da die mit Morphinpellets vorbehandelten Tiere in vivo in gleichem Maße Toleranz und Abhängigkeit entwickelt haben (gleiche Vorbehandlung), ist die unterschiedliche Basalaktivität der Testgruppen in vitro als unterschiedlich starker Spontanentzug aufgrund der unterschiedlichen Substitution mit Normorphin zu interpretieren. Demnach nimmt die Wirkung von Acetylcholin relativ zur Basalaktivität mit zunehmender Substitution bzw. mit steigendem Grad der aktuellen Opiat-Toleranz und -Abhängigkeit zu (Abb. 14).

Eine Überempfindlichkeit des Opiat-abhängigen, isolierten Dünndarmsegments gegenüber der Peristaltik-auslösenden Wirkung von Acetylcholin stünde mit der Modulation der Acetylcholinwirkung durch Opiode am peristaltischen Präparat (65; vgl. 3.1. und 4.2.) in Einklang.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zur näheren Charakterisierung der Funktionen endogener Opiode der Darmwand des Meerschweinchens werden Untersuchungen der Peristaltik und der Längsmuskelkontraktion in vitro sowie radioimmunologische Bestimmungen von aus der Darmwand freigesetztem Dynorphin durchgeführt. Es sollen hierbei Hinweise auf die beteiligten Populationen von Opiatrezeptoren, die Steuerung der Opiat-Freisetzung und die biologische Bedeutung endogener Opiode erhalten werden.

- 1) Opiode, die nach Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen sogenannte μ - oder k-Opiatrezeptoren aktivieren, zeigen hinsichtlich ihrer hemmenden Wirkung auf die elektrisch induzierte Längsmuskelkontraktion einerseits und die durch Acetylcholin ausgelöste Peristaltik andererseits eine ähnliche Rangfolge ihrer Wirkungsstärken.
- 2) SKF 10.047 aktiviert nach Untersuchungen anderer Autoren sogenannte δ -Rezeptoren und blockiert μ - und k-Rezeptoren. Dieser Partialagonist fördert nach den vorliegenden Ergebnissen die peristaltische Reflexaktivität und antagonisiert die hemmende Wirkung der μ - und k-Rezeptor-Agonisten auf die durch Acetylcholin ausgelöste Peristaltik. μ - und k-Rezeptoren scheinen daher für die Steuerung der Peristaltik größere Bedeutung zu besitzen als δ -Rezeptoren, die durch SKF 10.047 aktiviert werden.
- 3) SKF 10.047 hemmt, im Gegensatz zur Peristaltik, die elektrisch induzierte Längsmuskelkontraktion. Diese Hemmwirkung entspricht der durch andere Opiode ausgelösten Hemmung, denn sie ist wie diese durch Naloxon aufhebbar. δ -Rezeptoren sind demnach an der Regulation der Längs-

muskelkontraktion offenbar beteiligt. Sie dürften hierbei jedoch eine geringere Bedeutung als μ - oder κ -Rezeptoren besitzen, da SKF 10.047 im Gegensatz zu μ - und κ -Agonisten keine vollständige Hemmung der Längsmuskelkontraktion bewirkt.

- 4) Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, daß am isolierten Meerschweinchen-Dünndarm mindestens zwei Angriffspunkte für Opiode existieren: Ein Angriffspunkt, an dem die (elektrisch induzierte) Freisetzung von Acetylcholin, und ein zweiter, an dem die Wirkung von (exogenem) Acetylcholin moduliert wird.
- 5) Radioimmunologische Bestimmungen zeigen, daß Tetrodotoxin die Basal-Freisetzung von Dynorphin aus dem isolierten Darmsegment ins Organbad nicht hemmt. Dies könnte als Hinweis auf die mögliche Existenz spontan-aktiver "dynorphinerner" Neurone im Plexus myentericus gewertet werden. Versuche zur Dynorphin-Freisetzung in Anwesenheit von Levorphanol oder Naloxon ergeben keinen Anhalt für etwaige Rückkopplungsmechanismen, ohne Rückkopplungsmechanismen anderer Natur auszuschließen.
- 6) Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe zeigen einen Anstieg der Serumkonzentration von β -Endorphin unter dem Einfluß von akutem Streß. Die hier vorliegenden Versuche an Därmen neurogen gestreßter Meerschweinchen lassen eine Zunahme der Wirkung von Naloxon auf die Peristaltik erkennen. Dies könnte als Entzugsphänomen und damit als ein erster Hinweis auf die Entwicklung einer physiologischen Abhängigkeit von endogenen Opioiden unter Einwirkung von chronischem Streß gewertet werden.
- 7) Acetylcholin induziert am Opiat-toleranten/-abhängigen Darmsegment des Meerschweinchens mehr peristaltische Kontraktionen pro Zeiteinheit als an Kontrollsegmenten. Dies weist auf eine erhöhte Empfindlichkeit gegen-

über Acetylcholin als Teilmechanismus der Opiat-Toleranz am isolierten, intakten Darmsegment hin.

Die vorliegenden Versuche unterstützen somit die Annahme, daß in der Wand des Meerschweinchen-Dünndarms opiatartige Mechanismen existieren, die ähnliche Charakteristika zeigen, wie sie von der Wirkung exogener Opiate bekannt sind: Sie hemmen die Darmperistaltik, lassen die Beteiligung unterschiedlicher Opiatrezeptoren erkennen und unterliegen offenbar unter bestimmten Voraussetzungen der Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit.

6. TABELLEN

Tab. 1.1.1. - 1.1.6.: Wirkung verschiedener Opiode auf die durch exogenes Acetylcholin induzierte Peristaltik und partialantagonistische Wirkung von SKF 10.047.

Die Zahl peristaltischer Wellen pro 5 Minuten nach Acetylcholin-Applikation ($1 \mu\text{M}$) in Anwesenheit des jeweiligen Opioids wird als prozentuale Änderung angegeben, bezogen auf den Wert in Abwesenheit des Opioids (ACh-Ko.). Ebenso wird bei zusätzlicher Applikation von SKF 10.047 (40 nM) verfahren. p-Werte beziehen sich auf den Vergleich der Wirkung einer Opioid-Konzentration in An- und Abwesenheit von SKF 10.047.

Tab. 1.1.1.: Wirkung von β -Endorphin (β -E.; nM)

	ACh 1000 nM			ACh 1000 nM			ACh 1000 nM		
	Ko.	β -E.	%-Änderung	Ko.	β -E.	%-Änderung	Ko.	β -E.	%-Änderung
	10	11	+ 10	5	0	- 100	9	4	- 56
	7	6	- 14	15	6	- 60	6	7	+ 17
	13	13	0	11	5	- 55	11	7	- 36
	12	7	- 42	9	5	- 44	6	8	+ 33
	9	8	- 11	17	10	- 41	9	10	+ 11
	17	14	- 18	30	10	- 67	14	0	- 100
	17	16	- 6	29	25	- 14	7	21	+ 200
	8	8	0	18	20	+ 11	16	20	+ 25
	7	6	- 14	14	3	- 79	9	3	- 67
	7	6	- 14	13	11	- 15	12	16	+ 33
	6	6	0	18	7	- 61	9	10	+ 11
n	11	11	11	11	11	11	11	11	11
x			- 9,9			- 47,7			+ 6,5
SE			4,1			9,6			23,7
p									0,05

Tab. 1.1.2.: Wirkung von D-Ala²-D-Leu⁵-Enkephalin (DADL; nM)

ACh 1000 nM				ACh 1000 nM				ACh 1000 nM			
Ko.	DADL 15 nM	%-Ände- rung		Ko.	DADL 80 nM	%-Ände- rung		Ko.	DADL 80 nM SKF 40 nM	%-Ände- rung	
6	5	- 17		6	0	- 100		5	3	- 40	
15	0	- 100		12	10	- 17		10	11	+ 10	
7	8	+ 14		11	0	- 100		6	6	0	
13	9	- 31		8	6	- 25		8	8	0	
11	15	+ 36		14	0	- 100		13	7	- 46	
6	7	+ 17		12	0	- 100		9	8	- 11	
18	16	- 11		9	7	- 22		7	9	+ 29	
7	4	- 43		18	0	- 100		21	38	+ 81	
8	8	0		9	5	- 44		11	22	+ 100	
31	41	+ 32		9	6	- 33		9	10	+ 11	
35	42	+ 20		23	8	- 65		15	14	- 7	
10	14	+ 40		13	0	- 100		7	7	0	
7	10	+ 43									
7	8	+ 14									
9	9	0									
15	15	15		12	12	12		12	12	12	
		+ 0,9				- 67,2				+ 10,6	
		9,8				10,5				12,4	
										< 0,001	
n											
x											
SE											
p											

5
5
5
- 75,4
10,5

Tab. 1.1.3.: Wirkung von D-Ser²-L-Leu⁵-Enkephalyl-Thr (DSL; nM)

	ACh 1000 nM			ACh 1000 nM			ACh 1000 nM			ACh 1000 nM		
	Ko.	DSL 80 nM	%-Ände- rung	Ko.	DSL 400 nM	%-Ände- rung	Ko.	DSL 400 nM	%-Ände- rung	Ko.	DSL 1300 nM	%-Ände- rung
	7	5	- 29	14	0	- 100	4	0	- 100	13	7	- 46
	25	9	- 64	9	5	- 44	6	7	+ 17	9	0	- 100
	9	8	- 11	7	1	- 86	6	4	- 33	14	7	- 50
	6	4	- 33	14	0	- 100	11	0	- 100	18	6	- 67
	31	41	+ 32	8	0	- 100	7	0	- 100	8	4	- 50
	12	13	+ 8	8	6	- 25	8	10	+ 25	30	8	- 73
	6	6	0	16	7	- 56	9	12	+ 33			
	7	5	- 29	17	0	- 100	10	12	+ 20			
	15	4	- 73	8	7	- 13	10	13	+ 30			
	7	5	- 29	7	4	- 43	7	8	+ 14			
	7	14	+ 100	7	4	- 43	6	6	0			
	9	7	- 22	9	0	- 100	8	7	- 13			
	6	9	+ 50									
	9	8	- 11									
	7	5	- 29									
n	15	15	15	12	12	12	12	12	12	6	6	6
x			- 9,3			- 67,5			- 17,3			- 64,3
SE			11,3			9,7			15,4			8,4
p									0,01			

Tab. 1.1.4.: Wirkung von Dynorphin (Dyn; nM)

ACh 1000 nM			ACh 1000 nM			ACh 1000 nM			ACh 1000 nM		
Ko.	Dyn 0,6 nM	%-Ände- rung	Ko.	Dyn 0,6 nM	%-Ände- rung	Ko.	Dyn 4 nM	%-Ände- rung	Ko.	Dyn 4 nM	%-Ände- rung
5	5	0	5	5	0	9	6	- 33	11	8	- 27
12	3	- 75	5	4	- 20	25	5	- 80	7	7	0
6	5	- 17	7	7	0	9	1	- 89	4	1	- 75
8	6	- 25	5	4	- 20	8	4	- 50	7	5	- 29
10	4	- 60	9	8	- 11	14	4	- 71	15	5	- 67
7	6	- 14	5	5	0	9	5	- 44	8	7	- 13
9	8	- 11	7	7	0	11	0	- 100	10	9	- 10
5	0	- 100	3	6	+ 100	40	2	- 95	24	4	- 83
9	8	- 11	10	8	- 20	7	5	- 29	7	4	- 43
14	12	- 14	9	13	+ 44	25	0	- 100	34	8	- 77
21	17	- 19	24	21	- 13	29	7	- 76	23	8	- 65
5	5	0	6	6	0	9	2	- 78	7	4	- 43
7	8	+ 14	8	9	+ 13						
8	8	0	7	8	+ 14						
9	7	- 22	7	7	0						
15	15	15	15	15	15	12	12	12	12	12	12
		- 23,6			+ 5,8			- 70,4			- 44,3
		8,0			8,0			7,3			8,3
					0,02						0,03
n											
x											
SE											
p											

Tab. 1.1.5.: Wirkung von Ethylketocyclazocin (EK; nM)

ACh 1000 nM			ACh 1000 nM			ACh 1000 nM			ACh 1000 nM		
Ko.	EK 2 nM	%-Ände- rung	Ko.	EK 2 nM	%-Ände- rung	Ko.	EK 10 nM	%-Ände- rung	Ko.	EK 10 nM	%-Ände- rung
8	6	- 25	8	8	0	9	6	- 33	8	8	0
7	7	0	6	7	+ 17	6	1	- 83	9	6	- 33
7	3	- 57	7	6	- 14	14	2	- 86	7	4	- 43
8	3	- 63	9	5	- 44	12	0	- 100	6	0	- 100
8	6	- 25	8	5	- 38	6	0	- 100	6	0	- 100
7	6	- 14	7	7	0	13	7	- 46	15	10	- 33
12	9	- 25	10	9	- 10	12	7	- 42	20	9	- 55
14	5	- 64	9	8	- 11	5	0	- 100	5	3	- 40
9	8	- 11	10	9	- 10	33	0	- 100	31	0	- 100
20	8	- 60	9	10	+ 11	35	6	- 83	23	8	- 65
29	11	- 62	13	10	- 23	9	0	- 100	8	0	- 100
8	7	- 13	9	9	0						
6	6	0	7	7	0						
8	6	- 25	7	6	- 14						
14	14	14	14	14	14	11	11	11	11	11	11
n											
x		- 31,7			- 9,7			- 79,4			- 60,8
SE		6,5			4,5			7,9			10,5
p					0,01						n. s.

Tab. 1.1.6.: Wirkung von Normorphin (Nor; nM)

ACh 1000 nM				ACh 1000 nM				ACh 1000 nM				ACh 1000 nM			
Ko.	Nor	40 nM	%-Ände- rung	Ko.	Nor	200 nM	%-Ände- rung	Ko.	Nor	200 nM	%-Ände- rung	Ko.	Nor	1000 nM	%-Ände- rung
14	13		- 7	9	7		- 22	9	11		+ 22	7	7		0
9	8		- 11	14	4		- 71	14	16		+ 14	20	41		+ 105
8	7		- 13	6	6		0	7	9		+ 29	18	0		- 100
14	12		- 14	11	0		- 100	7	7		0	15	7		- 53
7	5		- 29	11	0		- 100	6	6		0	22	29		+ 32
8	9		+ 13	16	0		- 100	11	10		- 9	13	8		- 39
16	19		+ 19	8	0		- 100	9	11		+ 22	7	1		- 86
27	34		+ 26	25	9		- 64	21	20		- 5				
10	10		0	8	7		- 13	11	14		+ 27				
7	9		+ 29	26	39		+ 50	37	39		+ 5				
8	6		- 25	11	6		- 46	8	8		0				
18	6		- 67												
12	12		12	11	11		11	11	11		11	7	7		7
			- 6,6				- 51,5				+ 9,6				- 20,1
SE			7,8				15,2				4,1				27,1
P											0,001				

Tab. 1.2.: Wirkung von SKF 10.047 auf die durch exogenes Acetylcholin induzierte Peristaltik.

Angegeben ist die Zahl peristaltischer Wellen in 5 Minuten nach Acetylcholin-Applikation ($1 \mu\text{M}$) in Abwesenheit (ACh-Ko.) und in Anwesenheit von SKF 10.047, sowie die prozentuale Änderung.

	ACh 1000 nM			ACh 1000 nM			ACh 1000 nM			ACh 1000 nM		
	Ko.	SKF 0,2 nM	%-Ände- rung	Ko.	SKF 1 nM	%-Ände- rung	Ko.	SKF 4 nM	%-Ände- rung	Ko.	SKF 10 nM	%-Ände- rung
	12	12	0	21	13	- 38	6	5	- 17	7	10	+ 43
	17	15	- 12	18	26	+ 44	9	8	- 11	7	9	+ 29
	8	10	+ 25	10	11	+ 10	6	7	+ 17	4	5	+ 25
	11	11	0	13	12	- 8	5	6	+ 20	6	7	+ 17
	7	7	0	8	7	- 13	7	6	- 14	6	11	+ 83
	35	36	+ 3	35	44	+ 26	7	7	0	8	6	- 25
	39	40	+ 3	33	41	+ 24	6	6	0	7	7	0
	11	6	- 45	6	5	- 17	5	3	- 40	4	5	+ 25
	18	11	- 39	13	13	0				6	7	+ 17
	13	12	- 8	11	17	+ 55				7	7	0
	34	31	- 9	13	17	+ 31						
	30	25	- 17	18	26	+ 44						
n	12	12	12	12	12	12	8	8	8	10	10	10
$\bar{x}$			- 8,3			+ 13,2			- 5,6			+ 21,4
SE			5,5			8,3			6,9			9,1
P (gegen 0)			n.s.			n.s.			n.s.			0,03

Fortsetzung Tab. 1.2.

	ACh 1000 nM			ACh 1000 nM			ACh 1000 nM		
	Ko.	SKF 40 nM	%-Ände- rung	Ko.	SKF 200 nM	%-Ände- rung	Ko.	SKF 1000 nM	%-Ände- rung
	4	6	+ 50	7	13	+ 86	6	17	+ 183
	7	8	+ 14	10	30	+ 200	9	37	+ 311
	6	7	+ 17	6	10	+ 67	7	23	+ 229
	7	7	0	7	11	+ 57	6	13	+ 117
	5	7	+ 40	7	14	+ 100	6	13	+ 117
	7	8	+ 14	6	6	0	6	10	+ 67
	5	6	+ 20	6	6	0	5	5	0
	6	7	+ 17	4	5	+ 25			
	5	5	0	3	4	+ 33			
	4	4	0						
n	10	10	10	9	9	9	7	7	7
$\bar{x}$			+ 17,2			+ 63,1			+ 146,3
SE			5,3			20,8			39,3
P (gegen 0)			0,004			0,008			0,003

Tab. 1.3.: Einfluß von SKF 10.047 auf die peristaltische Reflexaktivität. Angegeben ist die Zahl peristaltischer Wellen in einem Zeitraum von 20 Minuten vor Applikation von SKF 10.047 (Ko.) und im gleichen Zeitraum nach Applikation, sowie die prozentuale Änderung. p-Werte beziehen sich auf den Vergleich mit den jeweiligen Kontrollwerten.

	Ko.	SKF (100 nM)	%-Ände- rung	Ko.	SKF (400 nM)	%-Ände- rung
	30	21	- 30	37	59	+ 59
	24	5	- 79	34	69	+ 103
	29	11	- 62	39	77	+ 97
	32	58	+ 81	39	108	+ 177
	24	24	0	22	38	+ 73
	31	37	+ 19	33	48	+ 45
	29	49	+ 69	38	56	+ 47
	19	19	0	37	70	+ 89
	41	46	+ 12	40	85	+ 113
	55	132	+ 140	39	76	+ 95
	33	22	- 33			
	67	38	- 43			
n	12	12	12	10	10	10
$\bar{x}$			+ 6,2			+ 69,8
SE			18,4			12,2
p			n. s.			<0,001

Tab. 1.4.1.: Wirkung verschiedener Opiode auf die elektrisch induzierte Längsmuskalkontraktion.

Angegeben ist die prozentuale Änderung der Amplitude.

Abkürzungen: DADL = D-Ala²-D-Leu⁵-Enkephalin; DSSL = D-Ser²-L-Leu⁵-Enkephalyl-Thr; EK = Ethylketocyclazocin.

Opiat Konz.	β-Endorphin		DADL		DSSL		Dynorphin		EK		Normorphin	
	20 nM	60 nM	10 nM	40 nM	30 nM	120 nM	0,3 nM	0,6 nM	0,8 nM	1,6 nM	40 nM	80 nM
	25	52	27	65	28	79	36	25	24	59	22	40
	35	77	39	80	21	54	28	50	46	59	49	85
	31	60	30	71	22	67	55	56	38	50	44	67
	22	45	37	74	27	65	44	57	40	68	24	48
	25	55	28	67	49	88	47	80	64	78	26	43
	24	41	33	66	23	60	39	62	33	46	48	70
	47	75			22	55					24	42
n	7	7	6	6	7	7	6	6	6	6	7	7
$\bar{x}$	30	58	32	71	27	67	42	55	41	60	34	56
SE	3	5	2	2	4	5	4	7	6	5	5	7

Tab. 1.4.2.: Wirkung von SKF 10.047 auf die elektrisch induzierte Längsmuskelkontraktion.

Angegeben ist die prozentuale Änderung der Amplitude.

SKF - Konz.	4 nM	10 nM	20 nM	40 nM	80 nM	160 nM
%	19	50	47	59	65	61
	9	18	26	39	44	44
	17	38	53	65	73	78
	12	22	32	44	53	55
n	4	4	4	4	4	4
$\bar{x}$	14	32	40	52	59	60
SE	2	7	6	6	6	7

Tab. 2.1.: Beispiel einer Eichreihe des Radioimmunassays für Dynorphin-(1-13).
 Angegeben sind die cpm von 4 Parallelbestimmungen ($\text{cpm}_1 - 4$), der entsprechende Mittelwert ($\overline{\text{cpm}}$) und die prozentuale Verdrängung des Tracers vom Antikörper durch das eingesetzte kalte Dynorphin (s. 2.3.4.).

Kaltes Dynorphin-(1-13) fMole/Ansatz	cpm_1	cpm_2	cpm_3	cpm_4	$\overline{\text{cpm}}$	%-Verdrängung $\frac{c_o - c_x}{c_o - c_u} \times 100$
2	3218	3224	3159	2692	3073	5,6
5	2936	2980	2682	2928	2882	12,0
7,5	2600	2529	2710	2678	2692	20,4
10	2592	2462	2398	2559	2503	24,6
20	2018	2080	2029	1900	2007	41,2
50	1432	1438	1446	1410	1432	60,3
100	1048	1031	1045	1007	1033	73,6
200	721	727	822	771	760	82,7
500	626	606	653	666	638	86,8
2000	468	472	445	627	503	91,3
c_o	3356	3324	3006	3283	3242	
c_u	242	210	273	238	241	
c_g	6082	7252	6211	6625	6543	
c_t	546	527	491	512	519	

Tab. 2.2.: Beispiel für die Gelfiltration und anschließende radioimmunologische Bestimmung des Gehalts an Dynorphin im Gewebeextrakt.

Angegeben ist die Menge an immunreaktivem Dynorphin in fMolen pro Fraktion.

Fraktions- nummer	fMole/ Fraktion	Fraktions- nummer	fMole/ Fraktion	Fraktions- nummer	fMole/ Fraktion
21	112	53	3400	85	86
22	60	54	4200	86	50
23	60	55	4300	87	0
24	42	56	3500	88	0
25	40	57	4200	89	0
26	0	58	4400	90	46
27	0	59	3000	91	0
28	0	60	4200	92	0
29	0	61	3700	93	0
30	0	62	4400	94	70
31	40	63	3400	95	0
32	70	64	2800	96	0
33	104	65	1920	97	0
34	104	66	2000	98	0
35	124	67	2300	99	0
36	104	68	4800	100	0
37	200	69	9200	101	0
38	152	70	10200	102	0
39	300	71	10600	103	0
40	420	72	7000	104	0
41	600	73	5000	105	0
42	820	74	3000	106	44
43	1040	75	2600	107	0
44	1800	76	2200	108	0
45	1800	77	1480	109	80
46	2600	78	1320	110	0
47	1560	79	560	111	0
48	560	80	500	112	0
49	360	81	220	113	0
50	860	82	90	114	0
51	2000	83	38	115	0
52	1560	84	0	116	0

Tab. 2.3.1. - 2.3.2.: Freisetzung von Dynorphin aus isolierten Darmsegmenten unter Ruhebedingungen in An- und Abwesenheit von Tetrodotoxin (100 nM). Angegeben ist der Gehalt an immunreaktivem Dynorphin in fMolen in den Fraktionen dreier unabhängiger Versuche (Fr.-Nr. = Fraktionsnummer).

Tab. 2.3.1.: Freisetzung von Dynorphin in Anwesenheit von Tetrodotoxin.

Fr.-Nr.	fMole 1	fMole 2	fMole 3	$\bar{x}$	Fr.-Nr.	fMole 1	fMole 2	fMole 3	$\bar{x}$
50	0	14	-	7	75	62	180	31	91
51	0	31	-	16	76	48	108	96	84
52	0	0	-	0	77	19	211	60	97
53	0	12	-	6	78	28	103	58	63
54	0	0	-	0	79	12	167	55	85
55	0	17	-	9	80	20	98	48	55
56	0	12	-	6	81	12	221	43	92
57	0	10	-	5	82	19	96	48	54
58	0	0	-	0	83	17	173	58	83
59	0	8	-	4	84	31	110	65	69
60	0	22	6	9	85	38	230	60	109
61	0	22	0	7	86	101	226	55	127
62	0	46	9	18	87	182	528	96	269
63	0	50	0	17	88	396	360	170	309
64	0	0	0	0	89	139	1488	276	634
65	0	36	17	18	90	288	816	396	500
66	0	10	11	7	91	110	1104	456	557
67	0	36	16	17	92	154	432	360	315
68	0	0	0	0	93	43	672	336	350
69	0	31	0	10	94	43	204	240	162
70	0	6	8	5	95	11	264	144	140
71	0	50	7	19	96	0	55	72	42
72	10	46	9	22	97	6	14	46	22
73	24	70	6	33	98	0	14	15	10
74	43	65	36	48	99	5	11	8	8

Fortsetzung Tab. 2.3.1.

Fr.-Nr.	fMole 1	fMole 2	fMole 3	$\bar{x}$	Fr.-Nr.	fMole 1	fMole 2	fMole 3	$\bar{x}$
100	0	0	12	4	109	0	0	-	0
101	0	14	-	7	110	0	22	-	11
102	0	0	-	0	111	4	0	-	2
103	0	0	-	0	112	0	0	-	0
104	0	22	-	11	113	0	0	-	0
105	0	22	-	11	114	0	0	-	0
106	0	0	-	0	115	0	0	-	0
107	5	6	-	6	116	0	0	-	0
108	0	26	-	13					

Gehalt der Fraktionen 70 - 88 (Retentionsbereich von Dynorphin-(1-13)) an immunreaktivem Dynorphin:

	fMole
Versuch 1	1062
Versuch 2	3068
Versuch 3	1009
n	3
$\bar{x}$	1713
SE	677,7
p (gegen Kontrolle, Tab. 2.3.2.)	n. s.

Tab. 2.3.2.: Freisetzung von Dynorphin in Abwesenheit von Tetrodotoxin (Kontrolle).

Fr.-Nr.	fMole 1	fMole 2	fMole 3	$\bar{x}$	Fr.-Nr.	fMole 1	fMole 2	fMole 3	$\bar{x}$
50	0	14	-	7	84	62	110	58	77
51	0	6	-	3	85	84	173	62	106
52	0	14	-	7	86	122	130	67	106
53	0	14	-	7	87	182	360	94	212
54	0	0	-	0	88	336	300	139	258
55	0	10	-	5	89	151	840	312	434
56	0	14	-	7	90	372	648	528	516
57	0	0	-	0	91	106	1344	480	643
58	0	7	-	4	92	106	600	576	427
59	0	0	-	0	93	30	864	312	402
60	0	0	31	10	94	32	300	230	187
61	0	36	0	12	95	9	432	178	206
62	0	14	17	10	96	0	142	60	67
63	0	0	11	4	97	9	192	36	79
64	0	0	12	4	98	6	70	12	29
65	0	19	9	9	99	0	36	0	12
66	0	26	16	14	100	0	11	0	4
67	0	31	15	15	101	0	9	-	5
68	0	17	9	9	102	0	0	-	0
69	0	22	0	7	103	0	22	-	11
70	8	34	0	14	104	0	29	-	15
71	0	38	0	13	105	0	11	-	6
72	10	0	8	6	106	0	0	-	0
73	10	108	9	42	107	0	26	-	13
74	46	0	24	23	108	0	26	-	13
75	106	67	17	63	109	0	0	-	0
76	72	65	46	61	110	0	0	-	0
77	34	163	82	93	111	0	0	-	0
78	32	98	65	65	112	0	0	-	0
79	16	216	62	98	113	0	0	-	0
80	24	134	53	70	114	0	0	-	0
81	24	173	48	82	115	0	11	-	6
82	0	64	62	49	116	0	6	-	3
83	26	206	53	95					

Fortsetzung Tab. 2.3.2.

Gehalt der Fraktionen 70 - 88 (Retentionsbereich von Dynorphin-(1-13)) an immunreaktivem Dynorphin:

	fMole
Versuch 1	1194
Versuch 2	2459
Versuch 3	949
n	3
$\bar{x}$	1543
SE	467,9

Tab. 2.4.1. - 2.4.3.: Freisetzung von Dynorphin aus isolierten Darmsegmenten unter Ruhebedingungen in Gegenwart von Levorphanol, Dextrorphan oder Naloxon. Die Fraktionen der Gelfiltration sind für 3 Versuche anhand der Albumin- und Tyrosin-Retentionen als relative Retention (%-Ret.) angegeben.

Tab. 2.4.1.: Freisetzung von Dynorphin in Gegenwart von Levorphanol.

%-Ret.	fMole 1	fMole 2	fMole 3	$\bar{x}$	%-Ret.	fMole 1	fMole 2	fMole 3	$\bar{x}$
60	0	0	0	0	73	38	21	46	35
61	0	0	0	0	74	47	18	59	41
62	0	0	0	0	75	70	34	69	58
63	0	3	0	1	76	70	39	62	57
64	0	5	0	2	77	83	38	77	66
65	0	5	0	2	78	62	34	54	50
66	0	7	0	2	79	57	22	42	40
67	0	13	0	4	80	36	15	28	26
68	0	10	0	3	81	19	8	15	14
69	0	7	0	2	82	5	2	5	4
70	2	10	18	10	83	0	0	0	0
71	13	13	27	18	84	0	0	0	0
72	25	13	35	24	85	0	0	0	0

Gehalt an immunreaktivem Dynorphin:

	fMole
Versuch 1	527
Versuch 2	317
Versuch 3	537
n	3
$\bar{x}$	460,3
SE	71,7

Tab. 2.4.2.: Freisetzung von Dynorphin in Gegenwart von Dextrorphan.

%-Ret.	fMole 1	fMole 2	$\bar{x}$	%-Ret.	fMole 1	fMole 2	$\bar{x}$
60	0	0	0	73	35	40	38
61	0	0	0	74	46	49	48
62	12	0	6	75	51	51	51
63	15	0	8	76	53	49	51
64	11	0	6	77	53	57	55
65	12	0	6	78	48	70	59
66	9	0	5	79	27	36	32
67	9	7	8	80	14	17	16
68	7	17	12	81	2	7	5
69	11	28	20	82	0	2	1
70	16	40	28	83	0	0	0
71	18	30	24	84	0	0	0
72	22	38	30	85	0	0	0

Gehalt an immunreaktivem Dynorphin:

	fMole
Versuch 1	471
Versuch 2	538
n	2
$\bar{x}$	504,5

Tab. 2.4.3.: Freisetzung von Dynorphin in Gegenwart von Naloxon

%-Ret.	fMole 1	fMole 2	$\bar{x}$	%-Ret.	fMole 1	fMole 2	$\bar{x}$
60	0	0	0	73	39	36	38
61	0	0	0	74	47	41	44
62	0	0	0	75	65	51	58
63	0	0	0	76	68	56	62
64	0	0	0	77	66	47	57
65	0	0	0	78	56	37	47
66	0	0	0	79	49	35	42
67	0	0	0	80	31	25	28
68	0	0	0	81	16	11	14
69	0	0	0	82	6	0	3
70	0	3	2	83	0	0	0
71	6	15	11	84	0	0	0
72	24	30	27	85	0	0	0

Gehalt an immunreaktivem Dynorphin:

	fMole
Versuch 1	473
Versuch 2	387
n	2
$\bar{x}$	430,0

Tab. 3.1. - 3.4.: Einfluß von neurogenem Streß auf die Naloxonwirkung am peristaltischen Präparat.

Angegeben ist die Zahl peristaltischer Wellen innerhalb von 15 Minuten vor Applikation von Naloxon (200 nM; Ko.) und in den 4 der Applikation folgenden 15-Minuten-Intervallen (+ 15', + 30', + 45', + 60'). Die prozentuale Änderung ist auf die jeweilige Aktivität in Abwesenheit von Naloxon bezogen.

Tab. 3.1.: Nicht gewaschene Segmente gestreßter Tiere.

Ko.	+ 15'	%-Ände- rung	+ 30'	%-Ände- rung	+ 45'	%-Ände- rung	+ 60'	%-Ände- rung
46	101	+ 120	53	+ 15	22	- 52	59	+ 28
44	102	+ 132	55	+ 25	45	+ 2	71	+ 61
21	71	+ 238	71	+ 238	40	+ 90	63	+ 200
29	105	+ 262	115	+ 297	98	+ 238	57	+ 97
33	85	+ 158	51	+ 55	49	+ 48	47	+ 42
45	82	+ 82	71	+ 58	79	+ 76	-	-
54	110	+ 104	74	+ 37	69	+ 28	59	+ 9
19	139	+ 632	99	+ 421	83	+ 337	75	+ 295
35	79	+ 126	70	+ 100	72	+ 106	55	+ 57
45	130	+ 189	61	+ 36	40	- 11	58	+ 29
61	88	+ 44	60	- 2	58	- 5	57	- 7
50	136	+ 172	85	+ 70	58	+ 16	-	-
50	93	+ 86	80	+ 60	49	- 2	46	- 8
57	139	+ 144	94	+ 65	100	+ 75	91	+ 60
44	118	+ 168	92	+ 109	62	+ 41	73	+ 66
32	135	+ 322	84	+ 163	80	+ 150	23	- 28
25	49	+ 96	26	+ 4	26	+ 4	31	+ 24
n	17	17	17	17	17	17	15	15
$\bar{x}$	40,6	103,6	73,0	+ 103,0	60,6	+ 67,1	57,7	+ 61,7
SE	3,0	6,5	5,2	28,0	5,6	23,9	4,4	21,7
p (gegen Ko.)	0,01	0,001	n. s.	0,05	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

Tab. 3.2.: Nicht gewaschene Segmente nicht gestreßter Tiere.

Ko.	+ 15'	%-Ände- rung	+ 30'	%-Ände- rung	+ 45'	%-Ände- rung	+ 60'	%-Ände- rung
15	57	+ 250	50	+ 233	31	+ 107	33	+ 120
13	25	+ 92	25	+ 92	16	+ 23	14	+ 8
32	68	+ 113	59	+ 84	58	+ 61	42	+ 31
51	130	+ 155	115	+ 125	64	+ 25	103	+ 102
20	30	+ 50	28	+ 40	18	- 10	29	+ 45
15	40	+ 167	41	+ 173	34	+ 127	34	+ 127
50	42	- 16	59	+ 18	39	- 22	37	- 26
17	72	+ 324	54	+ 218	41	+ 141	53	+ 212
30	59	+ 97	52	+ 73	49	+ 63	55	+ 83
17	47	+ 176	48	+ 182	43	+ 153	41	+ 141
27	40	+ 48	29	+ 7	26	- 4	27	0
41	116	+ 183	110	+ 168	110	+ 168	114	+ 178
28	49	+ 75	47	+ 68	24	- 14	51	+ 82
18	47	+ 161	53	+ 194	49	+ 172	26	+ 44
30	85	+ 183	43	+ 43	53	+ 77	44	+ 47
41	73	+ 78	73	+ 78	67	+ 63	58	+ 41
44	148	+ 236	72	+ 64	86	+ 95	76	+ 73
n 17	17	17	17	17	17	17	17	17
$\bar{x}$ 28,8	66,4	+ 141,3	56,4	+ 109,4	47,5	+ 73,2	49,2	+ 76,9
SE 3,1	8,5	21,3	6,1	17,4	6,0	15,9	6,5	15,5

Tab. 3.3.: Gewaschene Segmente gestreßter Tiere.

Ko.	+ 15'	%-Ände- rung	+ 30'	%-Ände- rung	+ 45'	%-Ände- rung	+ 60'	%-Ände- rung
46	89	+ 93	52	+ 13	54	+ 17	51	+ 11
30	110	+ 267	76	+ 153	72	+ 140	84	+ 180
33	121	+ 267	125	+ 279	72	+ 118	57	+ 73
55	113	+ 105	71	+ 29	75	+ 36	78	+ 42
27	52	+ 93	45	+ 67	43	+ 59	40	+ 48
42	92	+ 119	98	+ 133	121	+ 188	126	+ 200
34	135	+ 297	73	+ 115	98	+ 188	71	+ 109
30	61	+ 103	38	+ 27	27	- 10	54	+ 80
27	48	+ 78	48	+ 78	23	- 15	56	+ 107
56	137	+ 145	134	+ 139	65	+ 16	47	- 16
51	164	+ 222	141	+ 176	113	+ 122	140	+ 175
51	165	+ 224	95	+ 86	109	+ 114	118	+ 131
78	147	+ 88	139	+ 78	102	+ 31	102	+ 31
44	93	+ 111	58	+ 32	50	+ 14	57	+ 30
28	65	+ 132	38	+ 36	42	+ 50	37	+ 32
27	66	+ 144	40	+ 48	36	+ 33	25	- 7
10	28	+ 180	22	+ 120	16	+ 60	23	+ 130
n 17	17	17	17	17	17	17	17	17
$\bar{x}$ 39,4	99,2	+ 156,9	76,1	+ 94,6	65,8	+ 68,3	68,6	+ 79,8
SE 3,9	10,2	17,4	9,5	16,6	8,1	15,7	8,5	16,2
p (gegen Ko.) 0,004	0,02	n. s.	0,03	n. s.	0,05	n. s.	0,03	n. s.

Tab. 3.4.: Gewaschene Segmente nicht gestraßter Tiere.

Ko.	+ 15'	%Ände- rung	+ 30'	%Ände- rung	+ 45'	%Ände- rung	+ 60'	%Ände- rung
11	23	+ 109	20	+ 82	19	+ 73	10	- 9
16	38	+ 138	21	+ 31	20	+ 25	20	+ 25
39	90	+ 131	68	+ 74	70	+ 79	64	+ 64
34	56	+ 65	56	+ 65	54	+ 59	65	+ 91
22	35	+ 59	19	- 14	22	0	30	+ 36
18	72	+ 300	61	+ 239	47	+ 161	49	+ 172
24	81	+ 238	34	+ 42	45	+ 88	40	+ 67
21	65	+ 210	45	+ 114	32	+ 52	43	+ 105
22	98	+ 345	67	+ 205	57	+ 159	33	+ 50
11	23	+ 109	13	+ 18	0	- 100	27	+ 145
40	106	+ 165	72	+ 80	73	+ 83	68	+ 70
26	48	+ 85	31	+ 19	30	+ 15	24	- 8
24	63	+ 163	33	+ 38	25	+ 4	33	+ 38
32	55	+ 72	54	+ 69	26	- 19	52	+ 63
36	84	+ 133	52	+ 44	59	+ 64	38	+ 6
43	134	+ 212	97	+ 126	83	+ 93	78	+ 81
31	119	+ 284	127	+ 310	118	+ 281	116	+ 274
10	21	+ 110	20	+ 100	18	+ 80	15	+ 50
n 18	18	18	18	18	18	18	18	18
$\bar{x}$ 25,6	67,3	+ 162,7	49,4	+ 91,2	44,3	+ 66,5	44,7	+ 73,3
SE 2,4	7,9	20,0	7,1	19,7	6,8	19,2	6,2	16,2

Tab. 4.1. - 4.3.: Einfluß exogenen Acetylcholins am Dünndarmsegment
Morphin-abhängiger Meerschweinchen.

Angegeben ist die Zahl peristaltischer Wellen innerhalb 5 Minuten nach
Acetylcholin-Applikation (100 nM). Zur Ermittlung der Basalaktivität (BA)
wird die Zahl peristaltischer Wellen in einem Zeitraum von 20 Minuten vor
der ersten Acetylcholin-Applikation auf 5 Minuten umgerechnet.

Tab. 4.1.: Segmente nicht abhängiger Tiere (Kontrolle).

	BA	ACh 100 nM
	5,25	8
	9,75	13
	11,75	12
	6,75	6
	2	6
	8,25	6
	6,5	7
	4,5	11
	7	20
	4,5	7
	7,25	7
	5	8
	14,5	12
	4,5	10
	2,5	4
	6,25	5
n	16	16
$\bar{x}$	6,6	8,9
SE	0,8	1,0

Tab. 4.2.: Segmente abhängiger Tiere, Morphin-Substitution in vitro mit 10 nM Normorphin (linke Hälfte) bzw. 100 nM Normorphin (rechte Hälfte).

	Normorphin 10 nM		Normorphin 100 nM	
	BA	ACh 100 nM	BA	ACh 100 nM
	8,25	5	10,25	15
	14,25	7	17,75	9
	18	14	14	8
	24,25	41	14,5	19
	7,25	9	9	9
	10,5	8	7,75	6
	6,75	6	23,5	22
	9	11	17	19
	10	12	9,5	5
	10,5	7	12,5	20
	16,75	25	9	8
	7,5	8	8,5	8
	12,25	5	2,75	2
	16,25	22	11,25	8
	5	5		
n	15	15	14	14
$\bar{x}$	11,8	12,3	11,9	11,3
SE	1,4	2,6	1,4	1,7
p (gegen Kon- trolle)	0,003	n. s.	0,002	n. s.

Tab. 4.3.: Segmente abhängiger Tiere, Morphin-Substitution in vitro
mit 1 μM Normorphin (linke Hälfte) bzw 5 μM Normorphin (rechte Hälfte).

	Normorphin 1000 nM		Normorphin 5000 nM	
	BA	ACh 100 nM	BA	ACh 100 nM
	19	0	19,75	15
	8,25	13	4,5	8
	0	17	3,5	6
	4,75	7	8,75	20
	6,5	12	5,25	8
	5,5	9	2,25	18
	12,5	24	25,75	40
	5,25	9	6,5	0
	3,5	10	5,5	10
	6,5	15	3,5	9
	17,5	22	6,5	12
	2,5	10	5	13
	13	16	5,25	19
	12	17		
n	14	14	13	13
$\bar{x}$	8,3	12,9	7,8	13,7
SE	1,5	1,7	1,9	2,7
p (gegen Kon- trolle)	n. s.	0,04	n. s.	n. s.

Tab. 5.1.: Vergleich der Wirkung von Atropin (Atr.) und Pirenzepin (Pir.) auf die Spontanperistaltik (Reflexaktivität). Angegeben ist die Zahl peristaltischer Wellen in einem Zeitraum von 20 Minuten vor Applikation (Ko.) und nach Applikation des jeweiligen Anticholinergikums, sowie die prozentuale Änderung.

Atropin-Konz.	4 nM			20 nM			80 nM		
	Ko.	Atr.	%-Änderung	Ko.	Atr.	%-Änderung	Ko.	Atr.	%-Änderung
	11	14	+ 27	12	6	- 50	31	6	- 81
	25	32	+ 28	21	7	- 67	14	4	- 71
	21	25	+ 19	28	15	- 46	10	1	- 90
	14	18	+ 29	24	8	- 67	31	6	- 81
				34	17	- 50	20	2	- 90
							38	11	- 71
n	4			5			6		
$\bar{x}$	+ 25,8			- 56,0			- 80,7		
SE	2,3			4,6			3,5		
P (gegen Pir.)							0,001		

Fortsetzung Tab. 5.1.

Pirenzepin-Konz.	80 nM			400 nM			2000 nM			8000 nM		
	Ko.	Pir.	%-Änderung	Ko.	Pir.	%-Änderung	Ko.	Pir.	%-Änderung	Ko.	Pir.	%-Änderung
	13	16	+ 23	32	25	- 22	39	4	- 90	14	4	- 71
	14	7	- 50	13	6	- 54	21	5	- 76	27	2	- 93
	20	22	+ 10	25	17	- 32	21	4	- 81	20	2	- 90
	30	35	+ 17	28	13	- 54	28	20	- 29	14	1	- 93
	18	26	+ 44	24	14	- 42	18	13	- 28	22	2	- 91
	32	15	- 53	20	4	- 80						
n	6			6			5			5		
$\bar{x}$	-			1,5			-			-		
SE	16,5			47,3			60,8			87,6		
p (gegen Atr.)	0,001			8,3			13,4			4,2		
				0,01								

Tab. 5.2.: Vergleich der Wirkung von Atropin (Atr.) und Pirenzepin (Pir.) auf die durch Acetylcholin ausgelöste peristaltische Aktivität. Angegeben ist die Zahl peristaltischer Wellen innerhalb 5 Minuten nach Acetylcholin-Applikation ($1 \mu\text{M}$) in Abwesenheit (ACh-Ko.) und Anwesenheit des jeweiligen Anticholinergikums, sowie die prozentuale Änderung.

[illegible]

Fortsetzung Tab. 5.2.

Pirenzepin-Konz.	400 nM		2000 nM		8000 nM	
	ACh-Ko.	Pir. + ACh %Änderung	ACh-Ko.	Pir. + ACh %Änderung	ACh-Ko.	Pir. + ACh %Änderung
	15	4 - 73	16	9 - 44	5	0 - 100
	6	7 + 17	23	10 - 57	18	0 - 100
	11	10 - 9	13	4 - 69	31	0 - 100
			18	6 - 67	6	0 - 100
			16	4 - 75	13	0 - 100
n	3	3	5	5	5	5
$\bar{x}$		- 21,7		- 62,4		- 100
SE		26,7		5,4		0
p (gegen Atr.)		0,04				

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Adler, M. W.: The in vivo differentiation of opiate receptors: introduction. *Life Sci.* 28, 1543 - 1545 (1981)
- 2) Akil, H., S. J. Watson, J. D. Barchas, C. H. Li: β -Endorphin immunoreactivity in rat and human blood: Radioimmunoassay, comparative levels and physiological alterations. *Life Sci.* 24, 1659 - 1666 (1979)
- 3) Anhut, H., W. Knepel, D. Nutto, G. Hertting: Vasopressin stimulates release of β -lipotropin and β -endorphin in conscious rats as measured by radioimmunoassay of unextracted plasma. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 316, 59 - 63 (1981)
- 4) Berkenbosch, F., I. Vermes, R. Binnekade, F. J. H. Tilders: Beta-adrenergic stimulation induces an increase of the plasma levels of immunoreactive α -MSH, β -endorphin, ACTH and of corticosterone. *Life Sci.* 29, 2249 to 2256 (1981)
- 5) Birdsall, N. J. M., A. S. V. Burgen, R. Hammer, E. C. Hulme, J. Stockton: Pirenzepine - a ligand with original binding properties to muscarinic receptors. In: J. H. Baron, W. Londong (eds.): *Advances in basic and clinical pharmacology of pirenzepine. Scandinavian Journal of Gastroenterology*, pp. 1 - 4, Universitetsforlaget, Oslo, Vol. 15, Suppl. 66 (1980)
- 6) Breidenbach, T., A. König, S. Davies-Osterkamp, P. Raver, M. Luckhardt, K. Schwemmler, H. Teschemacher: Plasma levels of β -endorphin and β -LPH (" β -endorphin-like immunoreactivity") in humans in various stress situations. *Naunyn Suppl.* 307, R 67, No. 266 (1979)
- 7) Bülbring, E., A. Crema, G. B. Saxby: A method for recording peristalsis in isolated intestine. *Brit. J. Pharmacol.* 13, 440 - 443 (1958)
- 8) Chang, K. J., E. Hazum, P. Cuatrecasas: Multiple opiate receptors. *Trends Neurosci.* 3, 160 - 162 (1980)
- 9) Chavkin, C., A. Goldstein: Demonstration of a specific dynorphin receptor in guinea pig ileum myenteric plexus. *Nature* 291, 591 - 593 (1981)
- 10) Chavkin, C., I. F. James, A. Goldstein: Dynorphin is a specific endogenous ligand of the κ opioid receptor. *Science* 215, 413 - 415 (1982)

- 11) Clark, S. J., T. W. Smith: Peristalsis abolishes the release of methionine-enkephalin from guinea-pig ileum in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 70, 421 - 424 (1981)
- 12) Collier, H. O. J.: A pharmacological analysis of drug-dependence. In: H. M. Van Praag, F. De Erven, N. V. Bohn (eds.): *Biochemical and pharmacological aspects of dependence and reports on marihuana research*, pp. 23 - 45, Haarlem 1972
- 13) Collier, H. O. J., N. J. Cuthbert, D. L. Francis: Tolerance, dependence and quasi-dependence in the guinea-pig isolated ileum. In: E. L. Way (ed.): *Endogenous and exogenous opiate agonists and antagonists*, pp. 509 - 512, Pergamon Press, New York, 1980
- 14) Colt, E. W. D., S. L. Wardlaw, A. G. Frantz: The effect of running on plasma β -endorphin. *Life Sci.* 28, 1637 - 1640 (1981)
- 15) Conte-Devolx, B., P. Giraud, E. Castanas, F. Boudouresque, M. Orlando, P. Gillioz, C. Oliver: Effect of neonatal treatment with monosodium glutamate on the secretion of α -MSH, β -endorphin and ACTH in the rat. *Neuroendocrinology* 33, 207 - 211 (1981)
- 16) Cowan, A.: Simple in vivo tests that differentiate prototype agonists at opiate receptors. *Life Sci.* 28, 1559 - 1570 (1981)
- 17) Cox, B. N., K. E. Opheim, H. Teschemacher, A. Goldstein: A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. 2. Purification and properties. *Life Sci.* 16, 1777 - 1782 (1975)
- 18) Csontos, K., M. Rust, V. Höllt, W. Mahr, W. Kromer, H. J. Teschemacher: Elevated plasma β -endorphin levels in pregnant women and their neonates. *Life Sci.* 25, 835 - 844 (1979)
- 19) Daniel, E. E.: Pharmacology of the gastrointestinal tract. In: M. B. Visscher, A. B. Hastings, J. R. Pappenheimer, H. Rahn (eds.): *Handbook of Physiology. Section 6 (ed.: C. F. Code): Alimentary canal. Volume IV: Motility; Chapter 108*, pp. 2267 - 2324. American Physiological Society, Washington, D.C., 1968
- 20) Dubois, M., D. Pickar, M. R. Cohen, Y. F. Roth, T. Macnamara, W. E. Bunney, Jr.: Surgical stress in humans is accompanied by an increase in plasma beta-endorphin immunoreactivity. *Life Sci.* 29, 1249 - 1254 (1981)
- 21) Eipper, B. A., R. E. Mains: Analysis of the common precursor to corticotropin and endorphin. *J. biol. Chem.* 253, 5732 - 5744 (1978)

- 22) Farah, J. M., Jr., D. Sapun Malcolm, G. P. Mueller: Dopaminergic inhibition of pituitary β -endorphin-like immunoreactivity secretion in the rat. *Endocrinology* 110, 657 - 659 (1982)
- 23) Felix, W., J. Remien, K. Hüllfritsch: Zur Messung von Venenreaktionen im Tierversuch. *Pflügers Arch.* 329, 352 - 359 (1971)
- 24) Fletcher, J. E., R. G. Hill, T. A. Thomas: β -Endorphin and parturition. *Proceedings of the B. P. S.*, 9. - 11. April, 159P - 160P (1980)
- 25) Gacel, G., M. C. Fournie-Zaluski, B. P. Roques: D-tyr-ser-gly-phe-leu-thr, a highly preferential ligand for δ -opiate receptors. *FEBS Letters* 118, 245 - 247 (1980)
- 26) Genazzani, A. R., F. Facchinetti, D. Parrini: β -Lipotrophin and β -endorphin plasma levels during pregnancy. *Clinical Endocrinology* 14, 409 - 418 (1981)
- 27) Ghazarossian, V. E., C. Chavkin, A. Goldstein: A specific radioimmunoassay for the novel opioid peptide dynorphin. *Life Sci.* 27, 75 - 86 (1980)
- 28) Gibson, R. D., J. E. Tingstad: Formulation of a morphine-implantation pellet suitable for tolerance-physical dependence studies in mice. *J. pharm. Sci.* 59, 426 - 427 (1970)
- 29) Giraud, P., J.-C. Lissitzky, B. Conte-Devolx, P. Gilloz, C. Oliver: Influence of haloperidol on ACTH and β -endorphin secretion in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 62, 215 - 217 (1980)
- 30) Goland, R. S., S. L. Wardlaw, R. I. Stark, A. G. Frantz: Human plasma β -endorphin during pregnancy, labor, and delivery. *J. of Clinical Endocrinology and Metabolism* 52, 74 - 78 (1981)
- 31) Goldstein, A., R. Schulz: Morphine-tolerant longitudinal muscle strip from guinea-pig ileum. *Brit. J. Pharmacol.* 48, 655 - 666 (1973)
- 32) Goldstein, A., S. Tachibana, L. I. Lowmy, M. Hunkapiller, L. Hood: Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6666 - 6670 (1979)
- 33) Guillemin, R., T. Vargo, J. Rossier, S. Minick, N. Ling, C. Rivier, W. Vale F. Bloom: β -Endorphin and adrenocorticotropin are secreted concomitantly by the pituitary gland. *Science* 197, 1367 - 1369 (1977)

- 34) Hammer, R., C. P. Berrie, N. J. M. Birdsall, A. S. V. Burgen, E. C. Hulme: Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* 283, 90 - 92 (1980)
- 35) Hammer, R., F. W. Koss: Zum Wirkungsmechanismus des Magensekretionshemmers Pirenzepin. *Fortschritte der Medizin* 98, 549 - 554 (1980)
- 36) Haracz, J. L., A. S. Bloom, R. I. H. Wang, L.-F. Tseng: Effect of intraventricular β -endorphin and morphine on hypothalamic-pituitary-adrenal activity and the release of pituitary β -endorphin. *Neuroendocrinology* 33, 170 - 175 (1981)
- 37) Hendrix, T. R.: The motility of the alimentary canal. In: V. B. Mountcastle (ed.): *Medical Physiological*, Vol. II, pp. 1320 - 1347. C. V. Mosby Co., St. Louis, 1980
- 38) Hightower, N. C., Jr.: Motor action of the small bowel. In: M. B. Visscher, A. B. Hastings, J. R. Pappenheimer, H. Rahn (eds.): *Handbook of Physiology. Section 6* (ed.: C. F. Code): *Alimentary canal*. Vol. IV: *Motility*; Chapter 98; pp. 2001 - 2024. American Physiological Society, Washington, D.C., 1968
- 39) Ho, W. K. K., H. L. Wen, N. Ling: β -Endorphin-like immunoreactivity in the plasma of heroin addicts and normal subjects. *Neuropharmacology* 19, 117 - 120 (1980)
- 40) Höllt, V., R. Przewłocki, A. Herz: β -Endorphin-like immunoreactivity in plasma, pituitaries and hypothalamus of rats following treatment with opiates. *Life Sci.* 23, 1057 - 1066 (1978)
- 41) Höllt, V., R. Przewłocki, A. Herz: Radioimmunoassay of β -endorphin. Basal and stimulated levels in extracted rat plasma. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 303, 171 - 174 (1978)
- 42) Höllt, V., O. A. Müller, R. Fahlbusch: β -Endorphin in human plasma: Basal and pathologically elevated levels. *Life Sci.* 25, 37 - 44 (1979)
- 43) Höllt, V., I. Haarmann, K. Bovermann, M. Jerlicz, A. Herz: Dynorphin-related immunoreactive peptides in rat brain and pituitary. *Neurosci. Letters* 18, 149 - 153 (1980)

- 44) Holzer, P., F. Lembeck: Effect of neuropeptides on the efficiency of the peristaltic reflex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 307, 257 - 264 (1979)
- 45) Hughes, J.: Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.* 88, 295 - 308 (1975)
- 46) Hughes, J., T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan, H. R. Morris: Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258, 577 - 579 (1975)
- 47) Huidobro-Toro, J. P., K. Yoshimura, N. M. Lee, H. H. Loh, E. L. Way: Dynorphin interaction at the κ -opiate site. *Eur. J. Pharmacol.* 72, 265 - 266 (1981)
- 48) Hutchinson, J. S., A. Lim, R. DiNicolantonio, J. A. Clements, J. W. Funder: Immunoreactive β -endorphin levels in plasma and pituitary tissue from genetically hypertensive and normotensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 8, 455 - 457 (1981)
- 49) Imura, H., Y. Nakai: "Endorphins" in pituitary and other tissues. *Ann. Rev. Physiol.* 43, 265 - 278 (1981)
- 50) Iwamoto, E. T.: Locomotor activity and antinociception after putative μ , κ and σ opioid receptor agonists in the rat: Influence of dopaminergic agonists and antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 217, 451 - 460 (1981)
- 51) Johansson, O., T. Hökfelt, R. P. Elde, M. Schultzberg, L. Terenius: Immunohistochemical distribution of enkephalin neurons. In: E. Costa, M. Trabucchi (eds.): *The endorphins, Advances in biochemical psychopharmacology* 18, pp. 51 - 70. Raven Press, New York, 1978
- 52) Kalin, N. H., S. C. Risch, R. M. Cohen, T. Insel, D. L. Murphy: Dexamethasone fails to suppress β -endorphin plasma concentrations in humans and rhesus monkeys. *Science* 209, 827 - 828 (1980)
- 53) Kilbinger, H., I. Wessler: Inhibition by acetylcholine of the stimulation-evoked release of (^3H)-acetylcholine from the guinea-pig myenteric plexus. *Neuroscience* 5, 1331 - 1340 (1980)
- 54) Kosterlitz, H. W., V. W. Pirie, J. A. Robinson: The mechanism of the peristaltic reflex in the isolated guinea-pig ileum. *J. Physiol.* 133, 681 - 694 (1956)

- 55) Kosterlitz, H. W., A. J. Watt: The peristaltic reflex. In: E. E. Daniel, D. M. Paton (eds.): *Methods in pharmacology*. Vol. 3: Smooth muscle; Chapter 21, pp. 391 - 401. Plenum Press, New York, 1975
- 56) Kosterlitz, H. W., F. M. Leslie: Comparison of the receptor binding characteristics of opiate agonists interacting with μ - or κ -receptors. *Br. J. Pharmacol.* 64, 607 - 614 (1978)
- 57) Kromer, W., H. Teschemacher: An opiate withdrawal-like phenomenon in the fetal guinea pig ileum upon naloxone challenge. *Eur. J. Pharmacol.* 49, 445 - 446 (1978)
- 58) Kromer, W., W. Pretzlaff: In vitro evidence for the participation of intestinal opioids in the control of peristalsis in the guinea pig small intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 309, 153 - 157 (1979)
- 59) Kromer, W., W. Pretzlaff, R. Woinoff: Opioids modulate periodicity rather than efficacy of peristaltic waves in the guinea pig ileum in vitro. *Life Sci.* 26, 1857 - 1865 (1980)
- 60) Kromer, W., E. Scheiblhuber, P. Illes: Functional antagonism by calcium of an intrinsic opioid mechanism in the guinea-pig isolated ileum. *Neuropharmacology* 19, 839 - 843 (1980)
- 61) Kromer, W., R. Woinoff: Peristalsis in the isolated guinea-pig ileum during opiate withdrawal. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 314, 191 - 193 (1980)
- 62) Kromer, W., V. Höllt, H. Schmidt, A. Herz: Release of immunoreactive dynorphin from the isolated guinea pig small intestine is reduced during peristaltic activity. *Neurosci. Letters* 25, 53 - 56 (1981)
- 63) Kromer, W., W. Pretzlaff, R. Woinoff: Regional distribution of an opioid mechanism in the guinea pig isolated intestine. *J. Pharm. Pharmacol.* 33, 98 - 101 (1981)
- 64) Kromer, W., H. Hannemann, K.-F. Sewing, N. Steigemann, W. Vivell, U. Weißenborn: Relative potencies of atropine and pirenzepine in antagonizing cholinergic stimulation of guinea pig parietal cell H^+ -secretion and intestinal motility in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., Suppl.* 321, R 55, No. 217 (1982)

- 65) Kromer, W., H. Schmidt: Opioids modulate intestinal peristalsis at a site of action additional to that modulating acetylcholine release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 223 (1), 271 - 274 (1982)
- 66) Leslie, F. M., H. W. Kosterlitz: Comparison of binding of (^3H)-methionine-enkephalin, (^3H)-naltrexone and (^3H)-dihydromorphine in the mouse vas deferens and the myenteric plexus and brain of the guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.* 56, 379 - 383 (1979)
- 67) Leslie, F. M., C. Chavkin, B. M. Cox: Opioid binding properties of brain and peripheral tissues: Evidence for heterogeneity in opioid ligand binding sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214, 395 - 402 (1980)
- 68) Levin, E. R., B. Sharp, N. V. Meyer, H. E. Carlson: Morphine and naloxone: Effects on β -endorphin immunoreactivity in canine plasma and secretions from rat pituitaries. *Endocrinology* 109, 146 - 151 (1981)
- 69) Lissitzky, J. C., P. Giraud, B. Conte-Devolx, P. Gillioz, F. Boudouresque, R. L. Eskay, C. Oliver: β -Endorphin is present in high concentration in the hypophysial portal vessels of rats. *Neurosci. Letters* 19, 191 - 195 (1980)
- 70) Lord, J. A. H., A. A. Waterfield, J. Hughes, H. W. Kosterlitz: Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267, 495 - 499 (1977)
- 71) Mains, R. E., B. A. Eipper: Coordinate synthesis of corticotropins and endorphins by mouse pituitary tumor cells. *J. biol. Chem.* 253, 651 - 655 (1978)
- 72) Malizia, E., G. Andreucci, D. Paolucci, F. Crescenzi, A. Fabbri, F. Fraioli: Electroacupuncture and peripheral β -endorphin and ACTH levels. *The Lancet* 2, Nr. 8141, 535 - 536 (1979)
- 73) Martin, W. R.: Opioid antagonists. *Pharmacol. Rev.* 19, 463 - 521 (1967)
- 74) Martin, W. R., C. G. Eades, J. A. Thompson, R. E. Huppler, P. E. Gilbert: The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the non-dependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197, 517 - 532 (1976)
- 75) Martin, W. R.: Multiple opioid receptors. *Life Sci.* 28, 1547 - 1554 (1981)

- 76) Millan, M. J.: Stress and endogenous opioid peptides. A review. In: T. A. Ban et al. (eds.): Modern problems of pharmacopsychiatry, Vol. 17, pp. 49 - 67. S. Karger, Basel, 1981
- 77) Millan, M. J., H. M. Emrich: Endorphinergic systems and the response to stress. In: P. E. Sifnoes (ed.): Psychotherapy and psychosomatics 36, pp. 43 - 56. S. Karger, Basel, 1981
- 78) Miller, R.: Peptides as neurotransmitters: Focus on the enkephalins and endorphins. Pergamon Press 12, 73 - 108 (1981)
- 79) Mueller, G. P.: Beta-endorphin immunoreactivity in rat plasma: Variations in response to different physical stimuli. Life Sci. 29, 1669 - 1674 (1981)
- 80) Naber, D., M. G. Soble, D. Pickar: Ethanol increases opioid activity in plasma of normal volunteers. Pharmacopsychiat. 14, 160 - 161 (1981)
- 81) Narahashi, T.: Chemicals as tools in the study of excitable membranes. Physiol. Rev. 54, 813 - 888 (1974)
- 82) North, R. A.: Effects of morphine on myenteric plexus neurones. Neuropharmacology 15, 719 - 721 (1976)
- 83) Paton, W. D. M.: The action of morphine and related substances on contraction and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea-pig ileum. Brit. J. Pharmacol. 11, 119 - 127 (1957)
- 84) Pert, C. B., S. H. Snyder: Properties of opiate-receptor binding in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2243 - 2247 (1973)
- 85) Pert, C. B., A. M. Snowman, S. H. Snyder: Localization of opiate receptor binding in synaptic membranes of rat brain. Brain Res. 70, 184 - 188 (1974)
- 86) Pettibone, D. J., G. P. Mueller: α -Adrenergic stimulation by clonidine increases plasma concentrations of immunoreactive β -endorphin in rats. Endocrinology 109, 798 - 802 (1981)
- 87) Rang, H. P.: Stimulant actions of volatile anaesthetics on smooth muscle. Brit. J. Pharmacol. Chemother. 22, 356 - 365 (1964)
- 88) Rossier, J., E. D. French, C. Rivier, N. Ling, R. Guillemin, F. E. Bloom: Foot-shock induced stress increases β -endorphin levels in blood but not brain. Nature 270, 618 - 620 (1977)
- 89) Sapun, D. J., J. M. Farah, Jr., G. P. Mueller: Evidence that a serotonergic mechanism stimulates the secretion of pituitary β -endorphin-like immunoreactivity in the rat. Endocrinology 109, 421 - 426 (1981)

- 90) Shearman, G. T., A. Herz: Evidence that the discriminative stimulus properties of fentanyl and ethylketocyclazocine are mediated by an interaction with different opiate receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221, 735 - 739 (1982)
- 91) Siegel, R. A., N. Conforti, I. Chowers: Neural pathways mediating the prolactin secretory response to acute neurogenic stress in the male rat. *Brain Res.* 198, 43 - 53 (1980)
- 92) Simon, E. J., J. M. Hiller, I. Edelman: Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (^3H)etorphine to rat brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1947 - 1949 (1973)
- 93) Smith, A., H. H. Loh: Heterogeneity of opiate-receptor interaction. *Pharmacol.* 20, 57 - 63 (1980)
- 94) Smith, T. W., J. Hughes, H. W. Kosterlitz, R. P. Sosa: Enkephalins: isolation, distribution and function. In: H. W. Kosterlitz (ed.): *Opiates and endogenous opioid peptides*, pp. 57 - 62. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1976
- 95) Snyder, S. H., R. R. Goodman: Multiple neurotransmitter receptors. *J. Neurochem.* 35, 5 - 15 (1980)
- 96) Sosa, R. P., A. T. McKnight, J. Hughes, H. W. Kosterlitz: Incorporation of labelled amino acids into the enkephalins. *FEBS Letters* 84, 195 - 198 (1977)
- 97) Schaumann, O.: Some new aspects of the action of morphine-like analgesics. *Brit. med. J.* Nov. 10, 1956, 1091 - 1093 (1956)
- 98) Schaumann, W.: Inhibition by morphine of the release of acetylcholine from the intestine of the guinea-pig. *Brit. J. Pharmacol.* 12, 115 - 118 (1957)
- 99) Schulz, R., A. Goldstein: Morphine tolerance and supersensitivity to 5-hydroxytryptamine in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Nature* 244, 168 - 170 (1973)
- 100) Schulz, R.: Untersuchungen am Plexus myentericus des Meerschweinchens zum Problem von Opiat-Toleranz und -Abhängigkeit. Habilitationsschrift, München, 1977
- 101) Schulz, R., E. Faase, M. Wüster, A. Herz: Selective receptors for β -endorphin on the rat vas deferens. *Life Sci.* 24, 843 - 850 (1979)
- 102) Schulz, R., M. Wüster, H. Krenns, A. Herz: Lack of cross-tolerance on multiple opiate receptors in the mouse vas deferens. *Mol. Pharmacol.* 18, 395 - 401 (1980)

- 103) Schulz, R., M. Wüster, A. Herz: Pharmacological characterization of the ϵ -opiate receptor. J. Pharmacol. Exp. Ther. 216, 604 - 606 (1981)
- 104) Schulz, R., M. Wüster, P. Rubini, A. Herz: Functional opiate receptors in the guinea-pig ileum: Their differentiation by means of selective tolerance development. J. Pharmacol. Exp. Ther. 219, 547 - 550 (1981)
- 105) Tachibana, S., K. Araki, S. Ohya, S. Yoshida: Isolation and structure of dynorphin, an opioid peptide, from porcine duodenum. Nature 295, 339 - 340 (1982)
- 106) Terenius, L.: Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. Acta pharmacol. (Kbh.) 33, 377 - 384 (1973)
- 107) Terenius, L., A. Wahlström: Inhibitor(s) of narcotic receptor binding in brain extracts and cerebrospinal fluid. Acta Pharm. Tox. 35 (I), 55, No. 87 (1974)
- 108) Teschemacher, H., K. E. Opheim, B. M. Cox, A. Goldstein: A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. 1. Isolation. Life Sci. 16, 1771 - 1776 (1975)
- 109) Trendelenburg, P.: Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarmperistaltik. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 81, 55 - 129 (1917)
- 110) Wardlaw, S. L., R. I. Stark, L. Baxi, A. G. Frantz: Plasma β -endorphin and β -lipotropin in the human fetus at delivery: Correlation with arterial pH and pO_2 . J. of Clinical Endocrinology and Metabolism 79, 888 - 891 (1979)
- 111) Wardlaw, S. L., R. I. Stark, S. Daniel, A. G. Frantz: Effects of hypoxia on β -endorphin and β -lipotropin release in fetal, newborn, and maternal sheep. Endocrinology 108, 1710 - 1715 (1981)
- 112) Waterfield, A. A., H. W. Kosterlitz: Stereospecific increase by narcotic antagonists of evoked acetylcholine output in guinea-pig ileum. Life Sci. 16, 1787 - 1792 (1975)
- 113) Waterfield, A. A., R. W. J. Smokcum, J. Hughes, H. W. Kosterlitz, G. Henderson: In vitro pharmacology of the opioid peptides, enkephalins and endorphins. Eur. J. Pharmacol. 43, 107 - 116 (1977)

- 114) Watson, S. J., H. Akil, V. E. Ghazarossian, A. Goldstein: Dynorphin immuno-
cytochemical localization in brain and peripheral nervous system: Pre-
liminary studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1260 - 1263 (1981)
- 115) Weber, E., K. H. Voigt, R. Martin: Concomitant storage of ACTH- and endor-
phin-like immunoreactivity in the secretory granules of anterior pituitary
corticotrophs. *Brain Res.* 157, 385 - 390 (1978)
- 116) Wood, J. D.: Neurophysiology of Auerbach's plexus and control of intestinal
motility. *Physiol. Rev.* 55, 307 - 342 (1975)
- 117) Wood, J. D.: Intracellular study of effects of morphine on electrical activi-
ty of myenteric neurons in cat small intestine. *Gastroenterology* 79,
1222 - 1230 (1980)
- 118) Wood, P. L., S. E. Charleson, D. Lane, R. L. Hudgin: Multiple opiate recep-
tors: differential binding of μ , κ and δ agonists. *Neuropharmacology*
20, 1215 - 1220 (1981)
- 119) Wüster, M., R. Schulz, A. Herz: Specificity of opioids towards the μ -, δ -
and ϵ -opiate receptors. *Neurosci. Letters* 15, 193 - 198 (1978)
- 120) Wüster, M., P. Rubini, R. Schulz: The preference of putative pro-enkephalins
for different types of opiate receptors. *Life Sci.* 29, 1219 - 1227 (1981)
- 121) Wüster, M., R. Schulz, A. Herz: Multiple opiate receptors in peripheral tissue
preparations. *Biochem. Pharmacol.* 30, 1883 - 1887 (1981)
- 122) Zukin, R. S., S. R. Zukin: Multiple opiate receptors: Emerging concepts.
Life Sci. 29, 2681 - 2690 (1981)

Teile der vorliegenden Arbeit sind an folgenden Stellen veröffentlicht:

W. Kromer, N. Steigemann, G. T. Shearman: Differential effects of SKF 10,047 (N-Allyl,1-Normetazocine) on peristalsis and longitudinal muscle contractions of the isolated guinea-pig ileum. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 321, 218 - 222 (1982)

W. Kromer, N. Steigemann: Opiate tolerance/dependence in the isolated guinea pig ileum is associated with an increased sensitivity to acetylcholine. Pharmacology 25, 294 - 296 (1982)

Den Herren Prof. W. Forth und Prof. A. Herz danke ich vielmals für die Überlassung eines Arbeitsplatzes zur Durchführung der Versuche.

Herrn Prof. W. Kromer gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung.

Lebenslauf

09.02.1958 geboren in München

 Mutter: Sofia-Maria Steigemann, geb. am 24.12.1924

 Vater: Friedrich Steigemann, geb. am 06.12.1915

1958 - 1964 Kindheit in Icking/Isartal

1964 - 1968 Besuch der Volksschule am Mariahilfplatz zu München

1968 - 1977 Besuch des humanistischen Wilhelmsgymnasiums zu
München

1977 Abitur

1977 Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig Maximilians-Universi-
tät zu München

1979 Ärztliche Vorprüfung

1980 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1980 - 1982 Experimenteller Teil der vorliegenden Arbeit

1983 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1984 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung



